



**Universidade de** Departamento Química  
**Aveiro**  
**2016**

**André Simões  
Francisco**

**Estudo de biocidas na produção primária**





**Universidade de  
Aveiro  
2016**

Departamento de Química

**André Simões  
Francisco**

## **Estudo de biocidas na produção primária**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Ramo Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Luísa Serafim, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e coorientação do Engenheiro Marco Sebastião, responsável pela Área de Conceção e Desenvolvimento do Produto da Mistolin.



## **o júri**

Presidente

Prof. Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho  
Professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

Prof. Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira  
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal  
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores, o Engenheiro Marco Sebastião à Doutora Luísa Serafim e à Doutora Adelaide Almeida, pelo constante apoio e disponibilidade, por confiarem nas minhas capacidades, pelos conselhos e opiniões pertinentes ao longo de toda a tese e estágio.

Agradeço ao Departamento de Química, que me permitiu estudar e crescer num ambiente de proliferação científica, sempre com as melhores condições possíveis e que me permitiu obter uma formação base sólida que me deu asas para embarcar no desafio que é um estágio.

Agradeço também ao Departamento de Biologia e em concreto ao laboratório de M.A.A. por todo o apoio e ajuda, e em especial à Doutora Catarina pela dedicação e aconselhamentos constantes.

Agradeço também à Mistolin pela proposta de estágio que me colocou, confiando em mim e no meu trabalho e ainda por me ter permitido realizar o estágio nas suas instalações, onde fui tratado como um colaborador e não apenas como estagiário.

Agradeço ao Ricardo, Cristiana, Catarina, Mónica, Andreia e à Solange que me acompanharam neste ambiente empresarial, apoiando-me em todos os meus passos e fazendo com que nada me faltasse. Um grande obrigado a todos.

Agradeço também ao Eng. Ricardo Santos e ao Eng. Alcides Gonçalves pelas perguntas constantes que me levaram a querer saber sempre mais.

Às minhas três irmãs que sempre me ajudaram em todos e quaisquer problemas que fossem surgindo em todo este percurso realizado.

Agradeço também à Inês por tudo aquilo que aturou ao longo destes anos sem nunca me negar nada, percebendo e apoiando em tudo o que ia passando.

Por fim, à minha Mãe, pelo esforço que teve que fazer, apoiando sempre em todos os momentos e sem nada me negar, lutando diariamente para que tudo estivesse ao meu alcance.

Um grande OBRIGADO a todos!!!





## palavras-chave

Mistolin, DMC-80, biocidas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Fago phT4, *Aspergillus niger*

## resumo

É cada vez mais uma constante a procura de produtos melhores e mais eficazes, capazes de combater contaminações microbiológicas de superfícies e materiais. De forma a combater esta problemática, a Mistolin S.A. criou um produto biocida à base de compostos quaternários de amónia (QAC) e glutaraldeído ao qual atribuíram o nome de DMC-80. Este produto apresenta uma coloração ligeiramente rosa e um pH bastante ácido. No presente trabalho fez-se uma comparação do DMC-80 com alguns dos produtos biocidas existentes no mercado considerando as suas características principais. Uma caracterização da fórmula actual (FA) do DMC-80, mostrou que o seu pH ácido podia ser um problema para o utilizador durante o manuseamento do produto. Nesse sentido, testaram-se duas formulações do produto, a original de pH ácido e uma fórmula nova (FN) com pH mais neutro ao longo do trabalho experimental. Numa primeira fase analisou-se a estabilidade das formulações simulando condições de armazenamento, (40 °C durante 90 dias consecutivos). Utilizando FTIR obtiveram-se correlações superiores a 95 % entre o espectro obtido no último dia de estudo e o espectro do dia inicial, indicando pequenas alterações estruturais no produto, ao longo do tempo de armazenamento. Numa segunda fase testou-se a capacidade de bactericida das duas formulações de DMC-80, utilizando as bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Também foi testada a capacidade virocida utilizando o Fago phT4 como modelo de vírus entéricos e, a capacidade fungicida em ensaios com *Aspergillus niger*. A DMC-80 FN foi a formulação que apresentou melhor desempenho e estabilidade apresentando menores alterações estruturais após os 90 dias a 40 °C e com melhores resultados na inativação dos diferentes microrganismos em estudo, sendo sempre mais rápida que a DMC-80 FA. Face aos resultados obtidos propôs-se a comercialização do DMC-80 FN à Mistolin por ser uma alternativa viável e mais eficiente para os seus clientes.



**keywords**

Mistolin, DMC-80, biocidas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Fago pH4, *Aspergillus niger*

**abstract**

It is increasingly growing the demand for better and more effective products, capable to combating microbiological contamination in surfaces and materials. In order to combat this problem, Mistolin S.A. created a biocidal product based on quaternary ammonium compounds (QAC) and glutaraldehyde called DMC-80. This product has a slightly pink coloration and a very acidic pH. In the present work it was made a comparison of the DMC-80 with some existing commercial biocidal products, considering its main characteristics. The characterization of the current formula (FA) of DMC-80 showed that its acidic pH could be a problem for the user during the product handling. Therefore, two formulations of the product were tested, the original with acid pH and a new formula (FN) with more neutral pH. In the first phase, the stability of the formulations was tested by a simulated storage conditions (40 °C for 90 days). Using FTIR, correlations obtained were over 95% between the spectrum acquired in the last day of study and the spectrum of the initial day, meaning minor structural changes in the product. In the second phase, the bactericidal capacity of the two DMC-80 formulations was tested using *Escherichia coli* (Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) bacteria. Virocide ability was also tested using pH4 as model for enteric viruses and fungicidal capacity in *Aspergillus niger*. The DMC-80 FN was the formulation that presented better performance and stability showing minor structural alterations after 90 days at 40°C and with better results in the inactivation of the different microorganisms under study, being always faster than the DMC-80 FA. With that results, it was proposed the market introducing of the DMC-80 FN to Mistolin, as a viable and more efficient alternative for its customers.



## Índice

|  |     |
|--|-----|
| Índice de Figuras .....                                      | iii |
| Índice de tabelas .....                                      | v   |
| Abreviaturas: .....  | vii |
| 1. Introdução .....  | 1   |
| 1.1 Contextualização: Desafios na Indústria .....            | 2   |
| 1.2 A Mistolin – Produtos de Limpeza,S.A. ....               | 4   |
| 1.3 Biocidas .....   | 5   |
| 1.3.1 Definição e classificação.....                         | 6   |
| 1.3.2 Princípios ativos .....                                | 8   |
| 1.3.2.1 Ácidos iodados .....                                 | 8   |
| 1.3.2.2 Iodóforos .....                                      | 9   |
| 1.3.2.3 O hipoclorito de sódio .....                         | 9   |
| 1.3.2.4 Álcool etílico .....                                 | 9   |
| 1.3.2.5 Timerosal.....                                       | 10  |
| 1.3.2.6 Gluconato de Clorexidina: .....                      | 11  |
| 1.3.2.7 Glutaraldeído.....                                   | 12  |
| 1.3.2.8 Formaldeído .....                                    | 12  |
| 1.3.2.9 O óxido de etileno .....                             | 13  |
| 1.3.2.10 Peróxidos.....                                      | 13  |
| 1.3.2.11 Quaternários de amónia .....                        | 14  |
| 1.3.3 Meios e formas de aplicação de biocidas .....          | 15  |
| 1.3.3.1. Pedilúvio .....                                     | 15  |
| 1.3.3.2. Rodolúvio .....                                     | 16  |
| 1.3.3.3 Imersão.....   | 16  |
| 1.3.3.4 Pulverização .....                                   | 16  |
| 1.3.3.5 Aspersão.....  | 16  |
| 1.3.3.6 Fumigação .....                                      | 16  |
| 1.4. Avaliação de pontos críticos na agropecuária.....       | 16  |
| 1.4.1 Surto de doenças .....                                 | 16  |
| 1.4.2 Principais vias de contágio .....                      | 18  |
| 1.4.3 Principais microrganismos envolvidos nas doenças ..... | 19  |
| 1.5 Produto em estudo (DMC-80).....                          | 20  |
| 1.5.1 Introdução ao produto .....                            | 20  |
| 1.5.2 Matérias primas .....                                  | 21  |
| 1.5.2.1 Água desmineralizada .....                           | 21  |

|   |    |
|---|----|
| 1.5.2.2 Aquacid 105 EXP .....   | 21 |
| 1.5.2.3 Cloreto de benzalcónio .....  | 21 |
| 1.5.2.4 Cloreto dodecildimetilamónia.....   | 22 |
| 1.5.2.5 Glutaraldeído.....  | 22 |
| 1.5.3 Comparação com outros produtos presentes no mercado português.....  | 24 |
| 1.5.4 Custo/desempenho.....   | 25 |
| 1.6. Microrganismos em estudo.....  | 26 |
| 1.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 26 |
| 1.6.2 <i>Escherichia coli</i> .....   | 26 |
| 1.6.3 Bacteriófagos.....  | 27 |
| 1.6.4 <i>Aspergillus niger</i> .....  | 27 |
| 2. Material e Métodos.....  | 29 |
| 2.1 Matérias-primas utilizadas na preparação do biocida .....   | 30 |
| 2.2 Preparação das diferentes fórmulas. ....  | 30 |
| 2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada - FTIR-ATR ..... | 31 |
| 2.4 Microrganismos estudados e técnicas de cultura.....   | 31 |
| 2.4.1 <i>E. coli</i> : .....  | 31 |
| 2.4.2 <i>S. aureus</i> .....  | 33 |
| 2.4.3 Fago phT4.....  | 33 |
| 2.4.4 <i>A. niger</i> .....   | 33 |
| 2.5 Análise estatística dos ensaios .....   | 34 |
| 2.6 Fórmulas utilizadas.....  | 34 |
| 3. Resultados e Discussão .....   | 35 |
| 3.1 Estabilidade dos biocidas a 40 °C .....   | 36 |
| 3.2 Ensaio com <i>E. coli</i> .....   | 39 |
| 3.3. Ensaio com <i>S. aureus</i> .....  | 42 |
| 3.4 Ensaio com fagos .....  | 43 |
| 3.5 Ensaio com <i>A. niger</i> : .....  | 45 |
| 4. Conclusão .....  | 47 |
| 4.1 Conclusão e Perspetivas Futuras:.....   | 48 |
| 5. Bibliografia .....   | 50 |
| Bibliografia .....  | 48 |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Fachada atual da empresa Mistolin S.A. ....  | 5  |
| Figura 2: Esquema de um monómero Triiodado. ....   | 8  |
| Figura 3: Esquema do Hipoclorito de sódio. ....  | 9  |
| Figura 4: Fórmula química do álcool etílico ....   | 10 |
| Figura 5: Estrutura do Timerosal.....  | 11 |
| Figura 6: Estrutura do Gluconato de clorexidina .....  | 11 |
| Figura 7: Estrutura do Glutaraldeído.....  | 12 |
| Figura 8: Estrutura do formaldeído.....  | 12 |
| Figura 9: Estrutura do óxido de etileno.....   | 13 |
| Figura 10: Estrutura do peróxido de hidrogénio.....  | 14 |
| Figura 11: Estrutura do ácido peracético .....   | 14 |
| Figura 12: Esquema base dos compostos quaternários de amónia.....  | 15 |
| Figura 13: Representação dos locais de ação dos diferentes princípios ativos. (A) local de ação do cloreto de didecildimetilamónio. (B) local de ação do Cloreto de benzalcónio. (C) local de ação do glutaraldeído..... | 23 |
| Figura 14: Espectro FTIR-ATR de uma amostra de DMC-80 FA.....  | 36 |
| Figura 15: Espectro FTIR-ATR de uma amostra de DMC-80 FN .....   | 37 |
| Figura 16: Espectro FTIR-ATR de uma amostra de DMC-80 após subtração do espectro dada água .....   | 37 |
| Figura 17: Comparação dos espectros do dia inicial e o dia final do estudo para a F.A. com a correlação correspondente. ....   | 38 |
| Figura 18: Comparação dos espectros do dia inicial e o dia final do estudo para a F.N. com a correlação correspondente. ....   | 38 |
| Figura 19: Relação linear entre número de unidades formadoras de colónia de E. coli e a luz emitida medida no luminómetro. ....  | 39 |
| Figura 20: Redução de UFC de E. coli ao longo do tempo para diferentes concentrações [0,10; 0,25; 0,5; 0,75] % de DMC-80 F.A. ....   | 39 |
| Figura 21: Redução de UFC de E. coli ao longo do tempo para diferentes concentrações [0,10; 0,25; 0,5; 0,75]% de DMC-80 F.N. ....  | 41 |
| Figura 22: Redução de UFC de S. aureus nas presença de [0,1]% de DMC-80 .....  | 42 |
| Figura 23: Redução de placas fágicas ao longo do tempo na presença das diferentes fórmulas de biocida. ....  | 44 |
| Figura 24: Redução de colónias de Aspergillus niger ao longo do tempo, na presença das diferentes fórmulas de biocida nas concentrações [0,25; 0,5]% .....   | 45 |





## Índice de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Lista de produtos biocidas da Mistolin S.A.....  | 5  |
| Tabela 2:Relação entre o custo do produto por percentagem de matéria ativa para os diferentes produtos .....   | 25 |
| Tabela 3: Lista de matérias-primas químicas para formulação do DMC-80 .....  | 30 |
| Tabela 4:Diferenças entre as duas fórmulas de DMC-80.....  | 30 |
| Tabela 5: Compilação de resultados de redução (log) e eficácia (%) para as diferentes concentrações estudadas no tempo total dos ensaios com E. coli usando a DMC-80 F.A ..... | 40 |
| Tabela 6: Compilação de resultados de redução (log) e eficácia (%) para as diferentes concentrações estudadas no tempo total dos ensaios com E. coli usando a N.F.....         | 41 |
| Tabela 7:Compilação de resultados de redução (log) e eficácia (%) na inativação de S. aureus , com as diferentes formulas estudadas de DMC-80 .....                            | 43 |
| Tabela 8:Compilação de resultados de redução (log) e eficácia (%) para as diferentes fórmulas estudadas no tempo total dos ensaios com bacteriófago phT4 .....                 | 44 |
| Tabela 9:Redução logaritmica e eficácia de inativação de A. niger na presença de DMC-80 na concentração de 0,25% e 0,50% .....   | 46 |



## Abreviaturas:

ATR – Attenuated total reflection (Refletância Total Atenuada)

B2B – Business-to-business

B2C - Business-to-consumer

DGAV - Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

EU – União europeia

FA – Fórmula atual

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point ou Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos.

FN – Fórmula nova

PBS - Tampão Fosfato Salino

QAC – Compostos de amónia quaternária

TSB - Tryptic soy broth

TSA - Trypticase soy agar

UFC- Unidades formadoras de colónia

YGC - Yeast Extract Glucose Chloramphenicol



## 1. Introdução

---



## 1.1 Contextualização: Desafios na Indústria

Cada vez mais se tem vindo a estudar e a melhorar a qualidade da alimentação. No entanto, nem sempre é possível garantir que todos os produtos que chegam à mesa sejam de qualidade superior. É necessário então perceber, identificar e combater os problemas que existem na indústria agropecuária e que podem contribuir para a diminuição da qualidade dos alimentos.

Todos os animais de grandes criações têm que ser transportados para posteriormente serem abatidos em matadouros certificados. No entanto, durante o transporte, os animais estão sujeitos a elevada tensão, tendo sido estabelecida uma relação direta entre o tempo de transporte e a possibilidade de aumento de contaminações biológicas durante o mesmo (1).

O transporte de aves de capoeira é o mais comum a nível mundial no que toca a transporte de animais de exploração agrícola, estando estes sujeitos maior tensão. Além de níveis de estresse elevados, podem sofrer lesões físicas durante o processo de captura, carregamento, transporte e abate (2). O estresse, juntamente com a privação de comida e água podem levar à perda de peso, tornando o animal dormiente e até mesmo levar a acidificação da carne após o abate do mesmo. As variações de temperatura resultam no enfraquecimento do animal, tornando-o mais suscetível a agentes patogénicos (2).

O caso dos suínos é semelhante ao das aves, uma vez que as condições a que são sujeitos durante o transporte levam à sua exaustão, fazendo com que estes estejam sujeitos a níveis de estresse bastante elevados.(3)

Os principais problemas associados ao transporte de suínos incluem a síndrome do estresse porcino (o que resulta em perda de peso vivo em 4 - 6% e mortalidade em 0,1 - 0,4%), lesões, contusões, lesões de pele, cor anormal e infeção por *Salmonella*, entre outras (3),(4). Estes problemas tornam os animais fragilizados e suscetíveis a infeções por bactérias, fungos e vírus.

Tendo este panorama em consideração, irá relacionar-se a aplicação de biocidas na indústria agropecuária em geral, particularizando para a utilização de um biocida específico, o DMC-80, produzido pela Mistolin S.A., empresa portuguesa produtora de biocidas para diferentes aplicações.

O DMC-80 vai ser testado no âmbito deste projeto de mestrado em alguns microrganismos, *Escherichia coli*, como modelo de bactérias de Gram negativo, *Staphylococcus aureus* como modelo de bactérias de Gram positivo, o bacteriófago phT4, como modelo de vírus entéricos e o fungo *Aspergillus niger* como modelo de fungos filamentosos de forma a avaliar o potencial biocida do produto DMC-80 na inativação destes organismos.



## 1.2 A Mistolin – Produtos de Limpeza,S.A.

A Mistolin (Figura 1) é uma empresa 100% portuguesa, fundada em 1992, com sede no concelho de Vagos, distrito de Aveiro.

Ocupa atualmente uma área de 10 800 m<sup>2</sup> e emprega mais de 100 funcionários, sendo a maior empresa portuguesa de marca própria (5). A Mistolin opera na área da produção e comercialização de todo o género de detergentes líquidos, desde produtos de consumo doméstico a produtos de consumo industrial, tendo apresentado em 1997 produtos domésticos que incluíam lixívia, tira-gorduras e detergentes lava-tudo (5).

Em 2004, a Mistolin focou a sua produção em detergentes qualificados para uso industrial, comercial e em serviços, particularmente no designado canal HORECA (acrónimo para Hotéis, Restaurantes e Cafés) (5).

No ano de 2008, a Mistolin expandiu a sua produção para a área dos serviços, começando a fornecer assistência técnica e manutenção periódica a produtos e equipamentos. No mesmo ano passou a ser uma empresa certificada na implementação do sistema HACCP em outras empresas (5).

Hoje em dia, os produtos de uso doméstico da Mistolin estão direcionados para utilização na limpeza de superfícies de cozinhas, casas de banho ou automóveis, em roupas de diferentes tipos e em higiene pessoal. Possui seis marcas próprias e produz, igualmente, linhas brancas para marcas de distribuidor. Fabrica ainda produtos para uma larga gama de indústrias, nomeadamente agroalimentar, de pavimentos, automóvel, construção, limpeza, de higiene pessoal e de lavandaria. Atua em três áreas de negócio distintas, dando resposta aos mercados de B2C (Business to Consumer), que dizem respeito aos produtos de grande consumo – Mistolin doméstica – e mercados B2B, de consumo industrial – Mistolin profissional – e – Mistolin serviços.

É uma empresa certificada em Sistema de Gestão de Qualidade pela NP EN ISO 9001:2008, em Ambiente pela NP EN ISO 14001:2004, em Higiene, segurança e saúde no trabalho pela OSHAS 180001:2007 e Responsabilidade Social pela SA 80000:2008.(5)

A Mistolin é uma empresa líder no sector dos detergentes. Com parceiros comerciais nacionais e internacionais. Encontra-se sediada em Portugal, mas possui filiais em Espanha, França, Bélgica, Marrocos, Luxemburgo, Argélia, Cabo-Verde e Moçambique, exportando 40% de toda a sua produção. Produz anualmente 10 milhões de Kg de detergentes, tendo apresentado em 2015, vendas superiores a 10.000.000€.

Atualmente, a empresa apresenta 9 produtos biocidas (Tabela 1) destinados a desinfecção animal e de superfícies com diferenças na composição química e diferentes métodos de aplicação.

*Tabela 1: Lista de produtos biocidas da Mistolin S.A.*

|         |
|---------|
| DAN-R   |
| DMC-80  |
| DMF-25  |
| DMU-100 |
| DOV-60  |
| DPI-50  |
| PAC-55  |
| PAC-60E |
| PAC-70E |



*Figura 1: Fachada atual da empresa Mistolin S.A.*

## 1.3 Biocidas

### 1.3.1 Definição e classificação:

Um biocida é definido na legislação europeia como uma substância química ou um microrganismo com capacidade para destruir, inibir o crescimento ou inativar microrganismos indesejáveis (6).

Quando se fala de biocidas deve fazer-se a distinção entre a substância ativa biocida e os produtos biocidas. As substâncias ativas de um biocida são os compostos químicos que se encontram na fórmula do produto com a capacidade de combater os agentes patogénicos. No entanto, substâncias ativas misturam-se com outras não ativas que servem para garantir a eficácia, bem como o pH, a viscosidade, a cor, o odor desejado no produto final (6)(7).

Grande parte das substâncias ativas dos biocidas apresentam elevado nível de toxicidade para humanos, sendo por isso perigosos para o manuseamento do utilizador.

Os biocidas são normalmente usados na medicina, agricultura, silvicultura, indústria agropecuária, alimentar, tratamento de água de consumo e de recreio, entre outras aplicações (7).

No caso da água, o cloro é o biocida mais utilizado tanto na água das piscinas como na água canalizada (6).

A maior parte dos biocidas são sintéticos, no entanto existem também biocidas naturais, derivados de, por exemplo, bactérias e plantas.

Segundo a DGAV, um biocida pode ser classificado de acordo com:

- Um pesticida (tipo de pesticida-alvo):
  - Acaricidas - Ácaros
  - Algicida- Algas
  - Avicida - Pássaros
  - Desinfetante - Microrganismos
  - Bactericidas - Bactérias
  - Fungicidas - Fungos
  - Herbicidas - Plantas
  - Inseticidas - Insetos
  - Larvicida – Larvas de insetos
  - Molusquicida – Caracóis, lesmas
  - Nemasticida - Nematóides
  - Piscicida - Peixes

- Rodenticidas - Roedores
- Um antimicrobiano (tipo de antimicrobiano-alvo):
  - Germicidas - Germes
  - Antibacterianos - Bactérias
  - Antivíricos - Vírus
  - Antifúngicos - Fungos
  - Antiprotozoários - Protozoários
  - Antiparasitários - Helmintas

A classificação de biocidas segundo o Regulamento de Produtos Biocidas da EU divide-se em 4 grandes grupos, que posteriormente se dividem em vários subgrupos consoante o seu fim (8)(9):

- GRUPO 1: Desinfetantes e produtos biocidas gerais
- GRUPO 2: Conservantes
- GRUPO 3: Controlo de pragas
- GRUPO 4: Outros produtos biocidas

O produto estudado neste trabalho pertence ao 3º e o 4º subgrupos do grupo 1 também chamados por TP3 e TP4, respetivamente, que se caracterizam da seguinte forma: o subgrupo TP3 engloba os produtos utilizados para fins de higiene veterinária que incluem desinfetantes, sabões desinfetantes, produtos de higiene oral ou corporal, ou com função antimicrobiana (9). Este subgrupo de produtos é utilizado para desinfetar as superfícies e materiais associados com o alojamento ou transporte de animais (8).

O subgrupo TP4 inclui produtos utilizados na desinfeção de superfícies em contacto com os géneros alimentícios de origem animal incluindo equipamentos, recipientes, utensílios de consumo, superfícies ou condutas associadas à produção, ao transporte, à armazenagem ou ao consumo de géneros alimentícios de origem animal até à sua transformação para alimentação humana ou animal, incluindo água de consumo (8)(9).

### 1.3.2 Princípios ativos

Tal como já foi referido anteriormente, os biocidas são compostos por princípios ativos e não ativos. No que toca aos princípios ativos, existe uma gama alargada com diferentes potenciais de desinfeção, variando no tempo de ação, no pH, na estabilidade e na agressividade para os materiais.

#### 1.3.2.1 Ácidos iodados

Este é provavelmente o grupo germicida mais ativo, com um espectro de ação bastante alargado, uma vez que atua em bactérias, vírus e até mesmo esporos (10). Estes compostos atuam através da iodação das proteínas vitais dos microrganismos, alterando a sua estrutura e atuando também sobre os ácidos nucleicos. No entanto, a sua ação pode ser diminuída na presença de sangue e outros materiais biológicos.

Geralmente, os ácidos iodados (Figura 2) usam-se para higienizar a pele (ação desinfetante) e ainda para desinfeção de pequenas feridas. Nestes casos, são principalmente utilizados sob a forma de solução de iodo, como o álcool iodo-iodeto de potássio, que embora sejam altamente eficazes têm inconvenientes como reações de hipersensibilidade, irritação, queimaduras ou, raramente, eosinofilia (10).

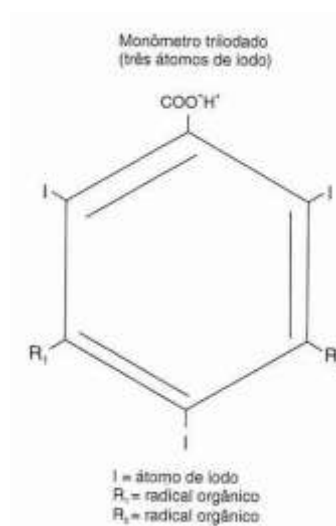


Figura 2: Esquema de um monómero Triiodado.

### 1.3.2.2 Iodóforos

Um iodóforo é um agente solubilizante ou transportador que se encontra combinado reversivelmente com o iodo. O complexo que resulta desta combinação apresenta uma capacidade de libertação lenta de iodo livre (10).

### 1.3.2.3 O hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio (Figura 3) é um dos desinfetantes mais antigos e é popularmente conhecido como lixívia. A sua substância ativa é o ácido hipocloroso que é indissociável. Este biocida funciona como bactericida para bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo, fungistático (especialmente para *Candida albicans*) e virucida (incluindo vírus HBV e HIV-1). É classificado como um desinfetante de nível intermediário (11).

Acredita-se que a sua ação se baseia na desnaturação de proteínas e, por isso, a presença de matéria orgânica na solução reduz a sua eficácia. No entanto, precisa de apenas alguns minutos para fazer efeito, exceto na desinfecção de água para consumo humano, no qual deve ser utilizado por períodos de tempo relativamente prolongados, pois é recomendado em concentrações baixas (11).

O facto de ser corrosivo para os metais limita também o modo como o hipoclorito de sódio é aplicado, além de ser instável a determinadas temperaturas e à luz.

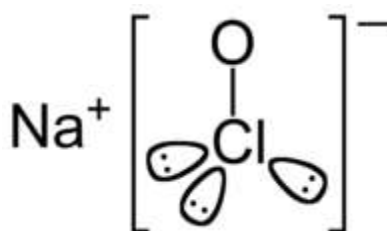


Figura 3: Esquema do Hipoclorito de sódio.

### 1.3.2.4 Álcool etílico

O álcool etílico (Figura 4) é a solução antisséptica mais económica e a mais antiga. Atua como desnaturante de proteínas e deve ser utilizado diluído a 70%, pois

concentrações mais altas não são tão eficazes. É considerado um bactericida e um fungicida moderado. No entanto, contra esporos apresenta uma eficácia baixa. Embora apresente um poder de ação bastante rápido, é de curta duração, pois tende a evaporar (12).

O álcool etílico utiliza-se na desinfecção de materiais e superfícies de pequena dimensão como termómetros, tampas e pequenos frascos mas pode danificar material de plástico (13).

É um composto inflamável devendo ser armazenado em locais frescos, ventilados e longe de qualquer fonte de ignição (14).

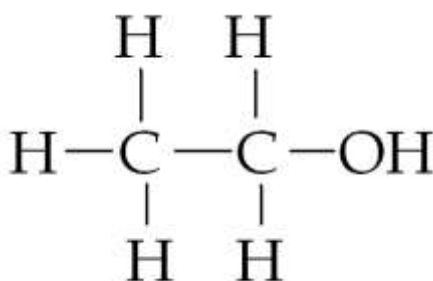


Figura 4: Fórmula química do álcool etílico

#### 1.3.2.5 Timerosal

O timerosal (Figura 5) é um antisséptico à base de mercúrio. A sua atividade bacteriostática resulta melhor em bactérias de Gram-positivo apresentando pouca ou nenhuma atividade sobre outros microrganismos (15).

Este composto é utilizado como conservante de soluções tópicas como gotas oftálmicas ou vacinas. No entanto, deve ser mantido sem exposição à luz, uma vez que se degrada caso não seja devidamente armazenado (15).

Este princípio ativo apresenta, no entanto, algumas debilidades, pois pode sofrer contaminações microbiológicas caso não seja devidamente armazenado. É também um produto altamente tóxico e irritante.

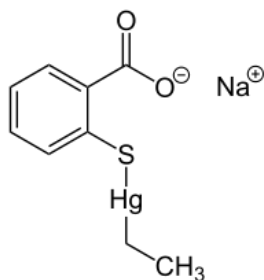


Figura 5: Estrutura do Timerosal

#### 1.3.2.6 Gluconato de Clorexidina:

O gluconato de clorexidina (Figura 6) é um antisséptico que combate bactérias de Gram-positivo e Gram-negativo, aeróbias e anaeróbias facultativas (12)(15). É normalmente utilizado em doentes, para os quais o iodo está contra indicado, podendo ser aplicado diretamente na pele, uma vez que apresenta uma taxa de absorção reduzida, no entanto, requer lavagem da zona onde foi aplicado após o tempo de atuação (16).

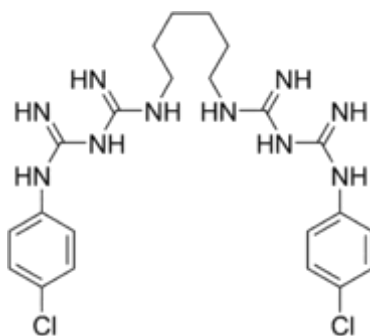


Figura 6: Estrutura do Gluconato de clorexidina



#### 1.3.2.7 Glutaraldeído

O glutaraldeído (Figura 7) reage com os grupos amino das proteínas, sendo um desinfetante com elevada eficácia no que toca a esterilização e como esporicida, contudo, a sua eficácia depende do pH, apresentando melhor atividade em meio alcalino (17).

A existência de matéria orgânica no meio faz com que a sua atividade fique reduzida podendo mesmo ser degradado (17)(12). Normalmente requer vários minutos para poder atuar e necessita de um posterior enxaguamento para garantir a sua limpeza completa. Este desinfetante é utilizado em situações drásticas de desinfeção onde é necessário garantir a eliminação total de contaminantes.

Apresenta alguns problemas, uma vez que é irritante para a pele humana e tem um elevado poder cancerígeno, sendo, por isso, necessários cuidados no seu manuseamento (18).

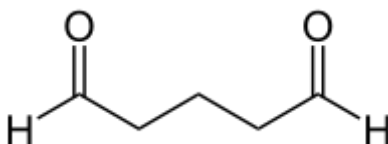


Figura 7: Estrutura do Glutaraldeído

#### 1.3.2.8 Formaldeído

O Formaldeído (Figura 8) pode ser utilizado sob a forma de líquido ou de gás. Apresenta-se como um bom bactericida, no entanto, necessita de um tempo maior para atuar comparativamente com o glutaraldeído. Apresenta também uma diminuição da eficácia na presença de matéria orgânica, uma vez que se liga facilmente a proteínas (12). A sua utilização é, no entanto, bastante limitada devido ao seu potencial carcinogénico (19).

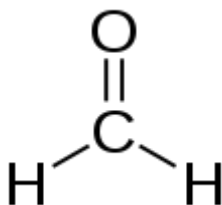


Figura 8: Estrutura do formaldeído

#### 1.3.2.9 O óxido de etileno

O óxido de etileno é um gás bastante solúvel em água e com ação esporicida. A sua eficácia deve-se à alquilação de ácidos nucleicos. Pode ser utilizado em esterilização em autoclaves, no entanto, requer uma temperatura de 58 °C durante 4 horas. O óxido de etileno (Figura 9) tem uma elevada difusibilidade com capacidade de penetrar papel, celofane, cartão, têxteis a até mesmo alguns plásticos. Porém, recomenda-se a sua utilização para valores de humidade na ordem dos 30 a 40%, uma vez que a sua eficácia depende das condições de humidade (12).

O óxido de etileno é extremamente inflamável, sendo, por isso, normalmente diluído com CO<sub>2</sub> ou outro gás inerte. No final da aplicação, é necessário garantir que nenhum gás fica retido na estrutura dos materiais, uma vez que estes resíduos são muito irritantes em contato com a pele, além de apresentarem potencial cancerígeno. Após a esterilização, o material deve permanecer "em quarentena" para garantir a completa eliminação de gás (12).



Figura 9: Estrutura do óxido de etileno

#### 1.3.2.10 Peróxidos

Neste grupo, os mais importantes são o peróxido de hidrogénio e o ácido peracético.

No caso do peróxido de hidrogénio (Figura 10), a sua atividade depende da concentração, sendo um bom bactericida e um esporicida moderado, no entanto, apresenta baixa estabilidade, degradando-se facilmente na presença de metais, sais metálicos, calor e agitação. É normalmente comercializado numa concentração de 3% e nesta forma é bastante estável e eficaz (20).

O ácido peracético (Figura 11) pode ser adquirido sob a forma de solução com concentração de aproximadamente 40% apresentando uma eficácia contra esporos bastante elevada (21).

Esta gama de desinfetantes apresenta um risco elevado não podendo contactar com certas superfícies uma vez que são corrosivos e são ainda tóxicos, sendo, por isso, necessários vários cuidados no seu manuseamento (20)(21).

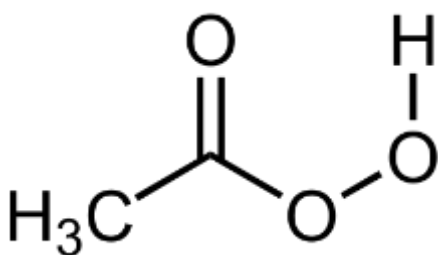


Figura 11: Estrutura do ácido peracético

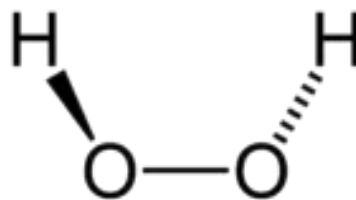


Figura 10: Estrutura do peróxido de hidrogénio

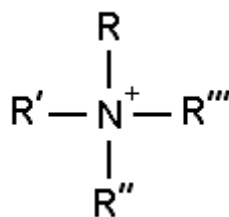
#### 1.3.2.11 Quaternários de amónia

Os compostos de amónia quaternária (QAC) agrupam diversos produtos químicos diversos mas que apresentam uma estrutura básica comum, na qual um átomo de azoto carregado positivamente está ligado a quatro átomos de carbono, formando um catião de carga positiva. Este catião normalmente forma um sal com um anião, geralmente cloreto ou brometo. Os QAC são bons agentes bactericidas, e atuam melhor em bactérias de Gram-positivo, que de Gram-negativo (figura 12).

Este é um grupo compatível com praticamente qualquer superfície e material (inclusivamente metais) pois não os danifica, nem se auto-degrada no contacto com eles. Por esta razão, são dos biocidas mais utilizados, ao nível da indústria alimentar, além de

serem facilmente aplicados e facilmente removidos, apresentam uma elevada performance sem degradar superfícies de contacto. Os QAC também exigem alguns cuidados de manuseamento, uma vez que podem provocar queimaduras na pele sendo bastante tóxicos para os ambientes aquáticos.

Os QAC podem ser aplicados por pulverização ou imersão, no entanto, podem produzir espumas e necessitam de um bom enxaguamento posterior.



*Figura 12: Esquema base dos compostos quaternários de amónia*

### 1.3.3 Meios e formas de aplicação de biocidas

A técnica para aplicação de qualquer produto depende do objetivo e dos biocidas a utilizar. Deste modo é necessário identificar as necessidades existentes e o grau de dificuldade ou possíveis entraves à aplicação do biocida (22). Existem várias técnicas para aplicar biocidas mas deve ser escolhida a mais apropriada para cada situação. As técnicas incluem:

#### 1.3.3.1. Pedilúvio

Esta técnica destina-se à desinfeção de calçado humano nas entradas das instalações. É especialmente utilizada no caso de visitas às propriedades rurais, pois muitas vezes os microrganismos podem ser introduzidos através das solas dos sapatos (22).

Esta técnica é frequentemente utilizada em quintas de suínos e avícolas, e em casos de feiras de exposições animais e nas salas de ordenha de propriedades leiteiras (22)(12).

#### 1.3.3.2. Rodolúvio

O rodolúvio aplica-se na entrada de viaturas em quintas para a desinfeção dos pneus, evitando o transporte de agentes infecciosos de uma quinta para a outra (12).

#### 1.3.3.3 Imersão

Nesta técnica utiliza-se água em ebulição ou uma solução contendo o desinfetante onde são mergulhados os materiais que se pretende desinfetar (12).

#### 1.3.3.4 Pulverização

Esta técnica aplica-se pulverizando-se o desinfetante por meio de bombas costais ou sob a forma de spray (22).

#### 1.3.3.5 Aspersão

A aspersão é um processo semelhante à pulverização, obtendo-se partículas menores (12).

#### 1.3.3.6 Fumigação

Neste processo aproveitam-se as libertações antissépticas de determinadas substâncias, por meio gasoso através, por exemplo, de queima de pastilhas ou pó de diversas composições (12).

### 1.4. Avaliação de pontos críticos na agropecuária

#### 1.4.1 Surtos de doenças

Existem vários casos relatados ao longo dos anos que mostram situações onde a contaminação microbiológica de aves ou suínos se propagou por vastas áreas. Os prejuízos causados pelos surtos de doenças altamente contagiosas devem ser tidos bastante em conta, uma vez que podem atingir grandes proporções.

Em agosto de 1998, numa zona rural da Carolina do Norte, EUA, surgiu um caso da Doença Respiratória dos Suínos. Rapidamente, milhares de suínos na criação industrial

adoeceram. Em menos de um ano a doença propagou-se por todo o país, tendo a rápida disseminação resultado do transporte de animais por longas distâncias (23).

Em 1997, o vírus Nipah surgiu numa zona rural da Malásia. Novamente o transporte de animais por longas distâncias permitiu a disseminação da doença pelo país em apenas sete meses. Este vírus, sendo bastante letal em humanos, colocou-o na lista dos EUA de potenciais agentes de bioterrorismo (24).

Outro exemplo de surto bastante divulgado foi o da gripe aviária causada pelo vírus influenza aviário H5N1, da mesma família dos vírus que provocam a gripe comum, mas com mutações genéticas (25).

Este vírus leva à morte rápida de grande parte dos animais infetados (25).

A gripe suína de 2009, que posteriormente se veio a chamar de gripe A, foi um surto global que atingiu o Mundo inteiro. Começou no México mas rapidamente se espalhou à América do Norte e pouco tempo depois à Europa e à Oceânia. Este vírus veio a ser identificado como sendo um mutante do vírus H1N1, responsável pela gripe espanhola (25).

#### 1.4.2 Principais vias de contágio

O sistema imunológico de um animal é o seu principal mecanismo de defesa contra a infecção mas este é facilmente afetado em condições de estresse a que os indivíduos possam ser sujeitos.

Durante uma viagem de longa distância, os animais são expostos a uma grande variedade de fatores físicos e psicológicos de estresse como a privação de água e alimentos, a mistura com grupos desconhecidos, o manuseio por seres humanos, a exposição a um ambiente novo, ruído e vibração, exercício extremos ou variações de temperatura e humidade. Estes fatores tornam os animais mais suscetíveis de sofrerem infeções microbiológicas durante transportes de longa distância (26).

Todos os fatores que ativam um estado de estresse animal resultam numa alteração das vias fisiológicas do organismo, por isso, quanto maior o número de fatores de estresse simultâneos, maior será a alteração resultando em problemas como danos nos tecidos ou o seu mau funcionamento, aumento da suscetibilidade a infeções e doenças e aumento da infecciosidade (27).

O transporte a longa distância aumenta a intensidade e a frequência dos contatos entre os animais resultando na propagação de doenças. Misturar animais desconhecidos é uma prática comum no transporte, tanto para homogeneizar o peso dos animais como para aumentar o lucro. Isso pode levar ao estresse animal e ferimentos em animais, uma combinação que facilita infeções e diminui o bem-estar (27).

A forma como os animais são transportados também é importante. Por exemplo, se as aves de capoeira são transportadas em grades e se estas grades são empilhadas umas em cima das outras, então as fezes podem passar a partir de uma caixa para outra, aumentando o risco de doenças (26).

### 1.4.3 Principais microrganismos envolvidos nas doenças

No que toca à indústria agropecuária são várias as doenças que podem ocorrer enfraquecendo os animais e por vezes resultando mesmo na sua morte, causando prejuízos económicos.

De forma a proteger os animais e obter os melhores produtos para os consumidores, os produtores de gado têm vindo a investir esforços para determinar e combater os microrganismos envolvidos em todas as etapas do processo.

De acordo com estudos já efetuados, é possível então criar uma lista resumida das principais bactérias, fungos e vírus mais importantes e comuns.

- Fungos:
  - *Absidia corymbifera*
  - *Aspergillus fumigatus*
  - *Aspergillus niger*
  - *Aspergillus versicolor*
  - *Cladosporium cladosporioides*
- Bactérias:
  - *Escherichia coli*
  - *Mycoplasma hyopneumoniae*
  - *Proteus vulgaris*
  - *Salmonella enteritidis*
  - *Staphylococcus aureus*
- Vírus:
  - *Adenovirus*
  - *Arterivírus*
  - *Birnavírus*
  - *Enterovírus*
  - *Orthomyxovirus*



## 1.5 Produto em estudo (DMC-80)

### 1.5.1 Introdução ao produto

A Mistolin S.A. apresenta-se no mercado com uma gama variada no que toca a desinfetantes, no entanto, neste trabalho vai ser estudado um único biocida desenvolvido por esta empresa designado por DMC-80 (5). O DMC-80 foi introduzido no mercado em 2013 para combater as necessidades de desinfeção apresentadas pelos utilizadores pertencentes à indústria agropecuária. A sua formulação é baseada em glutaraldeído e compostos quaternários de amónia de forma a abranger uma vasta gama de microrganismos.

Este produto aparenta ter bons resultados em processos de desinfeção veterinária (TP3) e na desinfeção de superfícies de contacto animal (TP4) (28). O DMC-80 F.A. apresenta-se atualmente no mercado como sendo um produto ácido não oxidante com forte poder bactericida e virucida, indicado para a indústria agroalimentar, com um pH entre [1,0 - 2,0]. Além disso é um desinfetante indicado para aplicação em superfícies previamente limpas e enxaguadas. Ideal para desinfeções em instalações agropecuárias, nomeadamente equipamentos, estábulos, pedilúvios, entre outros (28).

O DMC-80 apresenta uma densidade que ronda 0.98g/L, com uma percentagem de matéria ativa de cerca de 36.5% e taxa de biodegradabilidade superior a 90% (28). Visualmente, o produto apresenta ainda uma ténue coloração rosa (28).

### 1.5.2 Matérias-primas

O poder desinfetante do DMC-80 deve-se aos 3 princípios ativos que apresenta: dois QAC, o cloreto de didecildimetilamónio e o cloreto de benzalcónio, e glutaraldeído (28). No entanto existem duas outras matérias-primas não ativas, mas bastante importantes e essenciais no produto final, sendo elas a água e um agente estabilizante (Aquacid 105 EXP).

#### 1.5.2.1 Água desmineralizada

A água utilizada é obtida e tratada pela empresa através de água subterrânea. Esta água é desmineralizada por um conjunto de vários processos: adição de um agente coagulante que promove a precipitação do ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$  (sólido)); filtração através de um sistema de filtros de areia; tratamento com carvão ativado; filtração através de resinas de troca aniónica e catiónica e, por fim, adição de uma pequena quantidade de hipoclorito de sódio de modo a garantir o controlo de alguns parâmetros microbiológicos.

#### 1.5.2.2 Aquacid 105 EXP

AQUACID-105 EX é um organofosfonato com propriedades multifuncionais, como o sequestro, inibição limiar e estabilidade hidrolítica, como um único ativo ingrediente. Devido à combinação destas propriedades AQUACID-EX 105 EX tem uma ampla gama de aplicações. Uma das aplicações mais importantes na estabilização do produto.

#### 1.5.2.3 Cloreto de benzalcónio

O cloreto de benzalcónio ( $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{ClN}$ ) apresenta três categorias principais de utilização: como biocida, como tensioativo catiónico e ainda como agente de transferência de fase (29). É um princípio ativo de origem puramente sintética e apresenta-se como sendo um bom bactericida e fungicida, facto que se confirma com a sua utilização numa quantidade enorme de áreas e produtos, desde detergentes até produtos farmacêuticos (30). Este composto inibe o crescimento de determinadas bactérias, dificultando a sua proliferação. Usualmente atua na modificação de proteínas ou no rompimento da membrana plasmática (Figura 13) (29).

Apresenta-se como um líquido limpo mas comum cheiro forte e característico desta família de compostos

#### 1.5.2.4 Cloreto dodecildimetilamónio

O cloreto didecildemetilamónio ( $C_{22}H_{48}ClN$ ) é um desinfetante antisséptico muito utilizado como biocida, uma vez que apresenta um espectro bastante largo contra bactérias e fungos (31). Normalmente utiliza-se em hospitais, hotéis e indústrias (32). O cloreto de didecildimetilamónio tem como principal função o ataque a bactérias e fungos, causando a disrupção das interações intermoleculares e a dissociação das bicamadas lipídicas (Figura 13) (31). Este é o segundo princípio ativo mais presente no produto em estudo.

#### 1.5.2.5 Glutaraldeído

Por fim o glutaraldeído é utilizado para conseguir eliminar vírus, o que não é combatido pelos dois princípios ativos anteriores (17). Também conhecido como glutaral ou aldeído glutárico, o glutaraldeído ( $C_5H_8O_2$ ) é um dialdeído saturado, considerado como sendo um desinfetante eficiente no que toca à esterilização como esporicida. Encontra-se facilmente em produtos hospitalares e é característico pelo seu odor pungente. O glutaraldeído atua na alquilação de grupos sulfidril, hidroxil, carboxil e amino dos microrganismos alterando seu DNA, RNA e síntese de proteínas (17). A sua capacidade esporicida deve-se à capacidade de reagir com a superfície dos esporos, provocando o endurecimento das camadas externas, o que leva à inativação do esporo (Figura 13) (17).

Quanto à aplicação do DMC-80, este produto adequa-se para aplicação por pulverização ou por imersão, necessitando de um enxaguamento prévio, vital para remoção de matéria orgânica, e um enxaguamento posterior para remover os restos do produto.

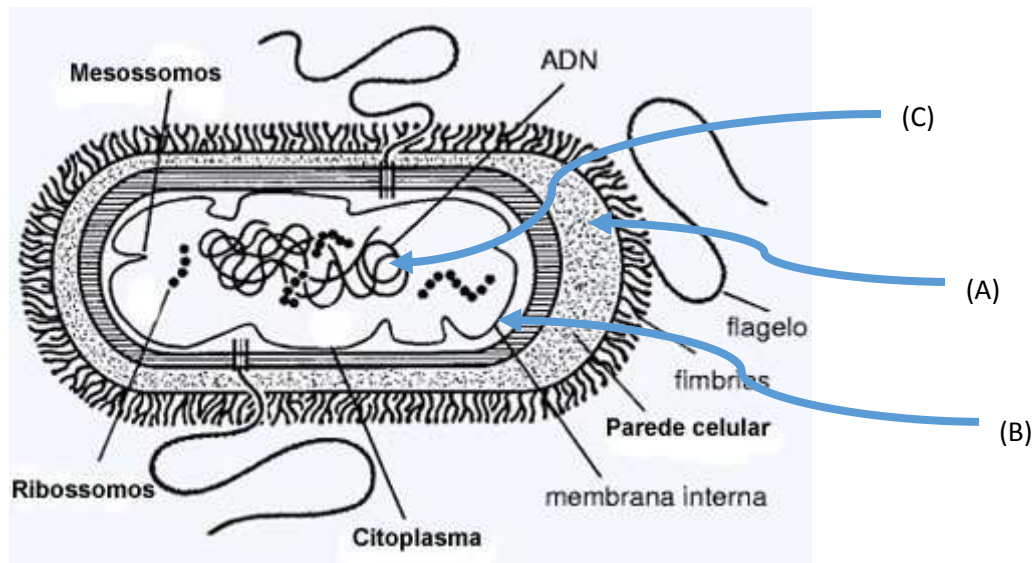


Figura 13: Representação dos locais de ação dos diferentes princípios ativos. (A) local de ação do cloreto de didecildimetilamônio. (B) local de ação do Cloreto de benzalcônio. (C) local de ação do glutaraldeído.

### 1.5.3 Comparação com outros produtos presentes no mercado português

Na indústria agropecuária pode ser utilizada uma larga gama de biocidas para diferentes objetivos e com diferentes formas de aplicação. Em Portugal, a Direção Geral de Saúde Veterinária (DGSV) publica a lista dos biocidas autorizados para uso veterinário com a informação do nome comercial do produto, a entidade responsável, as indicações e a composição de cada produto (8).

Dentro dos vários biocidas desta lista, os produtos com aplicação semelhante ao DMC-80 são os seguintes:

- TH5 pertencente à empresa Theseo é um desinfetante polivalente à base do QAC cloreto de alquildimetilbenzil amónio e glutaraldeído, num total de 42,7%, e que é eficaz contra uma larga gama de bactérias, vírus e fungos encontrados em animais e meios de transporte. Este desinfetante mostrou ser eficaz contra o vírus H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, responsável pela gripe aviária. É um produto fácil de aplicar, bastando apenas pulverizar em vez de ser preciso recorrer a máquinas de espuma (33).
- VIRAGRI PLUS VT 49 desenvolvido pela Johnson Diversey Portugal é um desinfetante não oxidante muito eficaz, especialmente formulado para aplicação na indústria agropecuária. Tendo como base uma mistura de glutaraldeído e dois QAC, o cloreto didecildemetilamónio e cloreto de benzalcónio, numa concentração de 25.5% de matéria ativa, este produto apresenta-se com um largo espectro de atividade bactericida e virucida, sendo também muito eficaz na higiene e saúde animal. Mostra-se como sendo polivalente, na medida em que pode ser aplicado através de pulverização e aspersão, sendo eficaz na prática de pedilúvio (34).
- Virkon S é um desinfetante sólido, multifacetado criado pela DuPont. Contém 49% de peroximonossulfato de potássio, sendo geralmente usado em desinfecção de superfícies de equipamentos e imersão. O Virkon S apresenta também um amplo espectro de atividade, sendo um bom bactericida e ainda virucida, no entanto, não é eficaz com esporos e apenas eficaz para alguns fungos (35).

#### 1.5.4 Custo/matéria ativa

A avaliação da razão custo/matéria ativa é provavelmente o fator mais importante para a escolha pelo consumidor final. O DMC-80 pode ser comparado com os produtos competidores através da razão custo por percentagem de matéria ativa.

*Tabela 2: Relação entre o custo do produto por percentagem de matéria ativa para os diferentes produtos*

| Nome do produto    | Cálculo da razão<br>(preço/percentagem de<br>matéria ativa) | Custo (€/ % de matéria ativa) |
|--------------------|---|-------------------------------|
| Viragri Plus VT 49 | $\frac{7,66}{25,5}$   | 0,30€/ % de matéria ativa     |
| Virkon S           | $\frac{67,59}{49}$  | 1,38€/ % de matéria ativa     |
| TH5                | $\frac{28,84}{42,7}$  | 0,68€/ % de matéria ativa     |
| DMC-80             | $\frac{8,96}{36,5}$   | 0,25€/ % de matéria ativa     |

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que o produto em estudo, DMC-80 é o que apresenta o preço mais baixo por percentagem de matéria ativa, tornando-o economicamente vantajoso em relação aos produtos concorrentes.

## 1.6. Microrganismos em estudo

### 1.6.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*, pertencente ao grupo dos cocos de Gram-positivo. É a espécie estafilocócica causadora de mais doenças alimentares graças às toxinas que é capaz de produzir. Esta bactéria está amplamente distribuída na natureza, sendo os reservatórios primários a pele e as membranas mucosas de mamíferos e pássaros. A sua introdução em ambiente de matadouros-frigoríficos e indústria alimentar normalmente ocorre através das mãos dos trabalhadores (36).

Tanto humanos como animais podem ser portadores de estafilococos nas narinas e até mesmo na garganta. No entanto, o Homem em particular, e uma vez que manipula os alimentos, é sem qualquer dúvida o maior veículo e a maior fonte de contaminação por esta bactéria (36).

*S. aureus* foi a causadora de um surto em 1998 em São Paulo no Brasil, envolvendo cerca de 1800 pessoas, das quais 1200 eram crianças em idade escolar. As crianças eram frequentadoras de pré-escolas e escolas primárias, onde lhes foi fornecido o almoço, que tinha sido previamente preparado pela cozinha piloto do município, e que posteriormente era embalada em tupperwares e de seguida transportada por carrinhas sem refrigeração. Este almoço era composto por arroz, feijão e farofa contendo farinha de mandioca e de milho, ervilha e milho verde em conserva e ainda enchidos como mortadela e linguiça tipo toscana. A ingestão deste almoço ocorreu (no caso das crianças) por volta das 15 h e após 30 a 90 minutos começaram a aparecer sintomas de típica intoxicação alimentar, como náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreias. Cerca de 90% dos afetados tiveram necessidade de recorrer a serviços de urgência, nos quais cerca de 5% ficou internado para posterior observação. Este foi um dos muitos casos que acontecem por contaminação com *S. aureus*, atingindo um elevado número de pessoas, mas que conseguiu ser resolvido rapidamente (37).

### 1.6.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar de Gram-negativo, anaeróbia facultativa que não produz esporos (1). Pode ser benéfica ou prejudicial para o organismo Humano, dependendo da estirpe e da quantidade em questão (4). É a mais comum e uma das mais antigas bactérias conhecidas como simbiontes do Homem, juntamente com *S. aureus*. No

que toca à indústria agropecuária, há predomínio de *E. coli* no ar atmosférico de currais e salas de abate como resultado das fezes dos animais, não sendo comum em câmaras de refrigeração.

Um dos surtos por contaminação por *E. coli* que afetou mais pessoas aconteceu em 2011 e decorreu da contaminação de pepinos através de uma estirpe enterohemorrágica rara denominada O104:H4. Esta estirpe produz a toxina Shiga que pode levar ao desenvolvimento da síndrome hemolítico-urémico, que nos casos mais graves leva a diarreias com sangue, falhas nos rins e eventual morte. Este surto causou até 1 de Junho de 2011, 17 mortes, 16 na Alemanha e 1 na Suécia. Mais uma vez o transporte de produtos contaminados foi o meio de propagação preferencial desta doença, chegando a toda a Europa em poucas semanas.

### 1.6.3 Bacteriófagos

Os seres humanos são expostos a vírus patogénicos através de várias vias e o desenvolvimento de doenças induzidas por vírus é uma ocorrência comum.

Embora a transmissão de doenças virais tenha sido reduzida pelo desenvolvimento de boas fontes de água e os procedimentos de higiene à base de toda uma gama de atividades humanas, os vírus patogénicos ainda causam várias doenças em seres humanos e outras espécies (38).

Um bacteriófago (também conhecido como fago) é um tipo de vírus capaz de infetar bactérias. São constituídos por material genético (DNA de dupla hélice em 95% dos fagos conhecidos) e por proteínas que formam a capsula que protege o ácido nucleico (38,39).

Os fagos têm sido muito usados como modelos de vírus entéricos.

### 1.6.4 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* é uma das espécies mais comuns do género *Aspergillus*. Esta espécie é bastante comum em contaminações de alimentos, sendo a principal responsável pela doença a que comumente se chama de bolor negro.

Esta espécie fúngica é omnipresente no solo, que pode crescer em folhas mortas, grãos armazenados, pilhas de compostagem e outra vegetação em decomposição sendo bastante comum em ambientes fechados podendo assim levar à confusão com colónias de outros fungos (40).



Produce esporos assexuados chamados conídios. Os esporos podem ser inalados durante o manuseamento de qualquer superfície ou objeto contaminado.

*A. niger* não é tão perigoso como o *Aspergillus fumigatus*, no entanto, produz várias toxinas, algumas inofensivas, mas outras bastante prejudiciais para o ser humano. As principais toxinas que produz são malformin C e a ocratoxina A que podem enfraquecer o sistema imunológico dos humanos podendo em casos extremos levar à morte do indivíduo. Estas toxinas podem ser inaladas pelos seres humanos, mais comumente as pessoas que trabalham em torno das plantas ou turfa, e pode causar uma doença pulmonar chamada aspergilose (40).

Esta espécie é também uma das causas mais comuns de infecções do ouvido (otomicose), os quais podem causar dor, perda de audição temporária, e, em casos severos, danos no canal auditivo e membrana timpânica (40).



## 2. Material e Métodos

---



## 2.1 Matérias-primas utilizadas na preparação do biocida

Para a preparação das diferentes fórmulas do biocida em estudo utilizaram-se diferentes matérias-primas provenientes de diferentes fornecedores, tal como apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Lista de matérias-primas químicas para formulação do DMC-80

| Matéria-prima/ Nome comercial | Matéria-prima                | Origem           |
|-------------------------------|------------------------------|------------------|
| Água desmineralizada          | Água desmineralizada         | Produção própria |
| BAC-80                        | Cloreto de benzalcónio       | Thor®            |
| DDQ-50                        | Cloreto dodecildimetilamónia | Thor®            |
| GDA-50                        | Glutaraldeido                | Thor®            |
| Aquacid 105 EXP               | Aquacid 105 EXP              | Aquitex®         |

## 2.2 Preparação das diferentes fórmulas.

A partir de uma fórmula existente e comercializada pela empresa, foi idealizada uma nova fórmula, diferente apenas no pH final do produto (DMC-80).

Tabela 4: Diferenças entre as duas fórmulas de DMC-80

| Parâmetros | DMC-80 Fórmula Atual (FA) | DMC-80 Fórmula Nova (FN) |
|------------|---------------------------|--------------------------|
| pH         | 0,97                      | 5,6                      |
| Cor        | Ligeiramente Rosa         | Incolor                  |

Foram então produzidas 2 fórmulas semelhantes que foram testadas neste trabalho, quer a nível de ensaios microbiológicos como a nível de testes de estabilidade.

Os diferentes valores de pH resultaram da adição de hidróxido de sódio 50% de modo a que se situassem no intervalo teórico de máxima eficácia dos vários princípios ativos.

As diferentes formulações foram preparadas em copos de vidro de 1000 mL, à temperatura de 22 °C e pressão atmosférica de 1atm com um agitador de varinha (AGV-8 Bunsen). A agitação de 30 rpm foi mantida contínua durante todo o processo e pelo menos 30 minutos após a adição do último composto, de modo a garantir total homogeneidade da fórmula. Durante a produção das fórmulas foram usadas as seguintes

balanças: balança eletrônica (Kern CKE Easy Count) e balança de precisão (Kern 440-35<sup>a</sup>).

No final da preparação de cada fórmula, o pH foi medido (C860 Multiparameter analyser, Consort). No caso da F.A. o pH encontrava-se sempre no intervalo definido [1,0 - 2,0], no entanto o pH da F.N. teve de ser ajustado com hidróxido de sódio a 50% para subir o pH e com Aquacid 105 EXP para fazer baixar, para o intervalo [5,0 - 6,0]. O pH foi analisado no dia inicial e no dia final da preparação, não se verificando alteração superior a ( $\geq 0,1$ ).

### 2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada - FTIR-ATR

A Espectroscopia de Infravermelho (IR) estuda a interação da matéria com a radiação da zona do infravermelho do espectro eletromagnético mais precisamente a absorção de energia da zona infravermelha do espectro eletromagnético. As mudanças de energias que ocorrem refletem as transições de estados vibracionais que as ligações das moléculas sofrem quando interagem com a radiação. (41)

Neste projeto foi utilizado o espectrómetro da empresa, um FTIR-ATR Bruker® Alpha-P (Bruker, Germany) com o acessório ATR Platinum Diamond 1. O software utilizado foi o OPUS 6.5.97, sendo que cada espectro teve como base 16 scans na amostra, com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, na região espectral de 4000-600 nm.

Antes de proceder à análise, o cristal foi limpo com álcool isopropílico e foi feita uma leitura atmosférica que o próprio software utiliza para fazer a subtração do impacto dos gases presentes na atmosfera. A amostra foi então colocada à superfície do cristal com uma pipeta de Pasteur e feita a análise. (41)

O espectro obtido no final deste procedimento foi usado como base para todas as manipulações feitas no software, como por exemplo a subtração da água ou a comparação com outros espectros.

### 2.4 Microrganismos estudados e técnicas de cultura

#### 2.4.1 *E. coli*:

Para controlar o processo de inativação usando como modelo uma bactéria Gram-negativa, foi usada uma estirpe de *E. coli* transformada com os genes luxCDABE da

bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* de forma a avaliar em tempo real a sua inativação através da leitura da luz num luminómetro (42). Esta estirpe de *E. coli* contém dois plasmídeos (pHK724 e pHK555) com o operão lux da bactéria marinha bioluminescente *V. Fischeri* necessário para a produção de luz. A estirpe de *E. coli* bioluminescente foi assepticamente inoculada em frascos de 30 mL de Tryptic Soy Broth (TSB), (Liofilchem, Italy) com 30 µL de ampicilina (Amp), (Applichem®, Germany) e 45 µL de cloranfenicol (Cm) (Applichem®, Germany) e crescidas durante 18 h a 120 rpm de agitação de forma a alcançar a fase estacionária de crescimento bacteriano (43)(44).

Para avaliar a relação entre as unidades formadoras de colónia (UFC) e o sinal bioluminescente da *E. coli*, foi avaliada a relação entre o número de unidades formadoras de colónias e a luz emitida de forma a obter-se uma reta de calibração cuja equação permite o cálculo das unidades formadoras de colónias na cultura bacteriana em função da luz emitida.

Para isso, foi cultivado 1 mL de suspensão de *E. coli* em 30 mL de TSB com antibióticos e deixado durante 18 h à temperatura ambiente a 120 rpm (44). Após este tempo de incubação foram realizadas várias diluições em tampão PBS (8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 7,4. Para as diferentes diluições foi então medida a luminescência usando um luminómetro (Glomax 20/20, Promega) e de seguida 100 µL de cada uma das diluições foram plaqueados em meio Tryptic soy agar (TSA) (Liofilchem, Italy) pela técnica de sementeira por incorporação para posteriormente determinar o número de UFC total nas diferentes diluições (43,44). Passado 24 h foram então contadas as UFC na diluição mais adequada.

Neste estudo foram testadas diferentes percentagens de agente biocida (0,010%; 0,025%; 0,050% e 0,075%) de forma determinar o potencial de desinfeção, assim como a sua eficácia e redução de UFC em diferentes tempos. A cultura fresca foi distribuída em tubos eppendorf aos quais foram adicionadas diferentes concentrações de biocida. Após a adição do composto foi medida a bioluminescência das amostras em diferentes tempos (0,1; 2,5; 5; 7,5 e 10 min) no luminómetro. Foram efetuados 3 ensaios independentes em diferentes datas.

#### 2.4.2 *S. aureus*

Utilizou-se uma estirpe de *S. aureus* com o código 2065MA sendo b-hemolisina, lipase, lecitinase, coagulase, thermonuclease e catalase positiva. (45)

Da suspensão bacteriana foi inoculado 500 µL em 30 mL de TSB e posteriormente foi incubada durante 18 h à temperatura de 26 °C sob a agitação de 150 rpm. Após a incubação foram aplicadas as duas fórmulas de biocida em estudo com uma concentração de 0,1% e tempos de contacto (0,1; 5 e 10 min) do produto com as bactérias, seguindo o protocolo descrito para *E. coli*. Estas amostras foram depois plaqueadas pela técnica de sementeira por incorporação em TSA e incubadas a 37° durante 24 h (45). Foram efetuados 3 ensaios independentes em diferentes datas.

Realizou-se sempre um controlo em cada ensaio, a bactéria foi incubada nas mesmas condições das amostras sem adição de biocidas.

#### 2.4.3 Fago phT4

O fago utilizado neste estudo foi o fago phT4 que é um vírus de DNA que infecta *E. coli* (ATCC 13706) (46).

Adicionou-se 500 µL de suspensão de fagos a 30 mL de meio TSA soft juntamente com 300 µL de *E. coli* ATCC 13706. A esta suspensão adicionou-se então 0,5% de DMC-80 nos tempos (0,1;2,5;5;7,5;10 min) e de seguida plaqueou-se em TSA, utilizando o método da dupla camada de agar (39).

Após 18 h a 37°C, foram então contadas as placas de lise na diluição mais adequada.

#### 2.4.4 *A. niger*

Culturas frescas de *A. niger* (KT964850) foram preparadas por sementeira por riscado em placas de meio YGC (Liofilchem, Italy) sólido durante 5 dias a 26 °C (40). Para cada ensaio, a amostragem foi feita por adição de 10 mL de soluto de Ringer (Merck Milipore, Germany) por cada placa (3 placas por ensaio) de forma a remover o conteúdo celular e de esporos de cada amostra, utilizando a metodologia descrita por Costa et al. 2016 (40). Para cada ensaio foram recolhidos 30 mL de suspensão. A suspensão foi



homogeneizada no Stomacher Bagmixer (Interscience, France) e, de seguida, distribuída em diferentes tubos de Eppendorf (40) nos quais foram aplicados 0,5% de biocida e, posteriormente, plaqueada em YGC (duplicado), em vários tempos (0,1;5;10; min). Posteriormente incubou-se durante 3 a 5 dias a 26 °C e contou-se o número UFC. Foram realizados 3 ensaios independentes.

## 2.5 Análise estatística dos ensaios

A análise estatística foi realizada no software Graphpad Prism 6.01. A significância dos parâmetros avaliados foi testada através de uma one-way ANOVA, utilizando o pós-teste de Tukey, após verificar a normalidade da distribuição dos dados através do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Quando  $p < 0,05$  os valores foram considerados estatisticamente diferentes.

## 2.6 Fórmulas utilizadas

Para o cálculo da eficácia e redução de colónias nos ensaios realizados foram aplicadas duas fórmulas.

Fórmula 1:

$$\text{Redução de colónias} = \text{média}(\log(\text{UFC } t_0)) - \text{média}(\log(\text{UFC } t_{\text{final}}))$$

A fórmula 1 permitiu o cálculo da redução logarítmica de UFC através da diferença entre o logaritmo de UFC no tempo final e inicial.

Fórmula 2:

$$\text{Eficácia}(\%) = \frac{|\text{média}(\log(\text{UFC } t_{\text{final}})) - \text{média}(\log(\text{UFC } t_0))|}{\text{média}(\log(\text{UFC } t_0))}$$

A fórmula 2 foi utilizada para o cálculo da eficácia de inativação para os diferentes microrganismos.



### 3. Resultados e Discussão

---



### 3.1 Estabilidade dos biocidas a 40 °C

Este capítulo destina-se à análise das duas fórmulas estudadas e a sua degradação durante a sua exposição a temperaturas elevadas.

Como o consumidor final nem sempre respeita as normas de armazenamento indicadas pelo produtor, armazenando em grande parte dos casos os produtos em condições de elevada temperatura e com grandes variações da mesma simulou-se durante 90 dias a degradação das diferentes fórmulas numa estufa com temperatura constante (40 °C) de forma a estudar a sua degradação das fórmulas de uma forma acelerada.

Em IR, é possível distinguir duas regiões do espectro: acima de 1500 cm<sup>-1</sup>, os picos ou bandas são característicos de grupos funcionais e podem ser relativamente bem identificados sem ambiguidades; abaixo de 1500 cm<sup>-1</sup>, é a chamada zona de “impressão digital” de um composto, ou mistura, neste caso, não é possível atribuir uma banda ou pico a somente um grupo funcional. É preciso ter em atenção que qualquer banda nesta região é o resultado de um intrincado conjunto de vibrações e ligações existentes na mistura. Uma banda pode ser resultado de um grupo funcional, como de uma ligação entre grupos funcionais. Desta forma, é possível avaliar de forma muito simples os espectros apresentados nas Figuras 14 e 15:

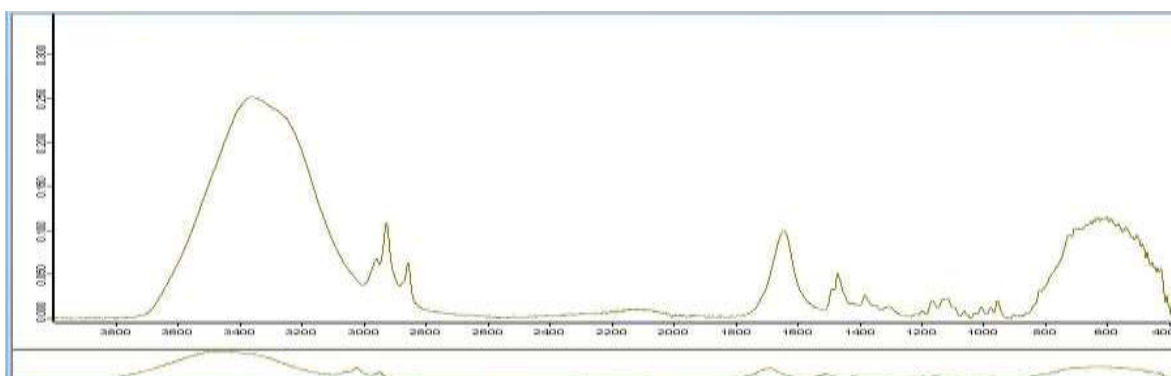


Figura 14: Espectro FTIR-ATR de uma amostra de DMC-80 FA

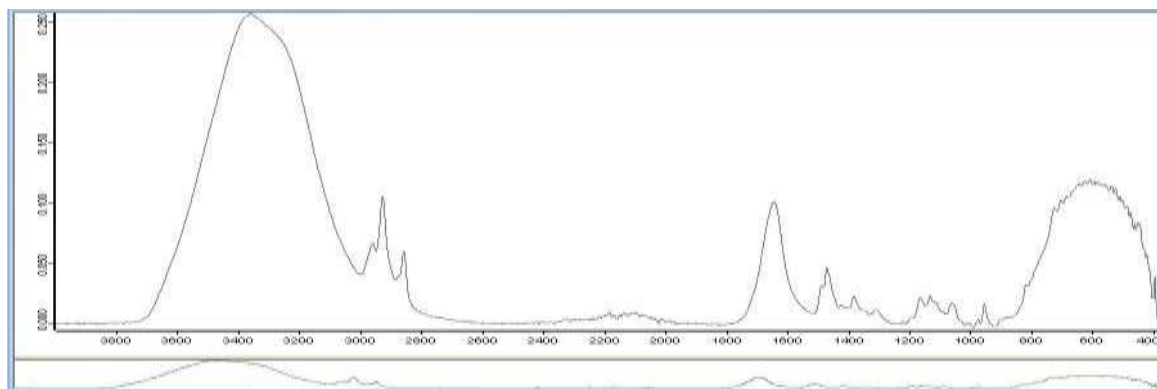


Figura 15: Espectro FTIR-ATR de uma amostra de DMC-80 FN

Os espectros apresentados nas figuras anteriores (Figura 14 e Figura 15), foram obtidos sem a manipulação do espectro ou da fórmula, sendo que a única correção que se fez foi a correção da linha de base. Os espectros obtidos são idênticos no que diz respeito a números de onda, diferindo muito ligeiramente na intensidade de alguns picos menos fortes. É possível verificar a existência de 3 bandas, que se destacam claramente e que se encontram na ordem dos 3400, 1650, e 900 - 400  $\text{cm}^{-1}$ . Tendo em conta a elevada percentagem de água existente nesta formulação, é preciso definir quais destas bandas são as bandas características da água. Para tal, foi necessário obter o espectro da água utilizada na fábrica para o fabrico dos produtos. Para tentar avaliar o espectro minimizando a interferência da água, foi efetuada então a subtração do espectro da água, anteriormente determinado, obtendo-se espectros como os apresentados na Figura 16.

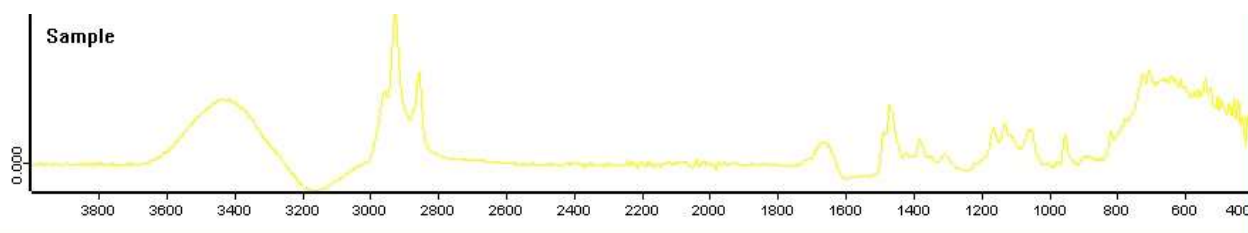


Figura 16: Espectro FTIR-ATR de uma amostra de DMC-80 após subtração do espectro dada água

Recorrendo a uma funcionalidade do software utilizado, foi então possível calcular a correlação entre o espectro obtido no fim dos 90 dias com o espectro obtido no primeiro dia (figura 18 e 19).

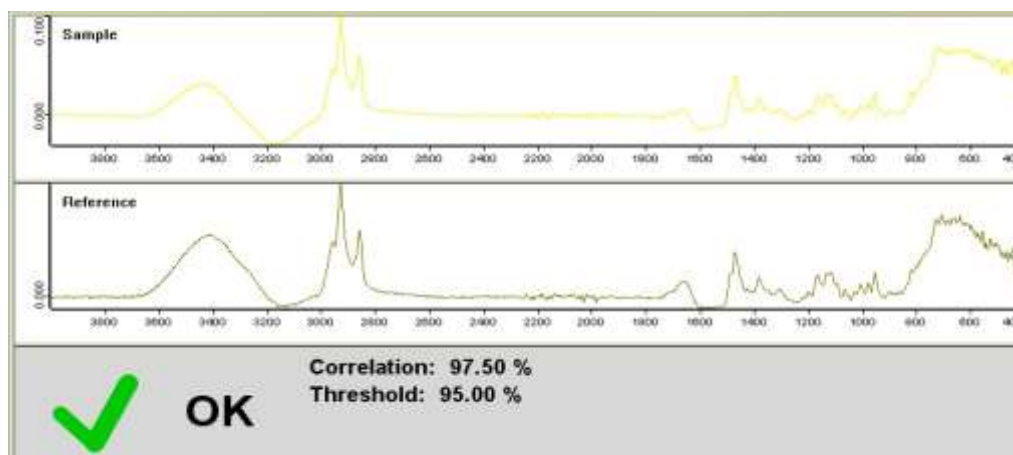


Figura 17: Comparação dos espectros do dia inicial e o dia final do estudo para a F.A. com a correlação correspondente.

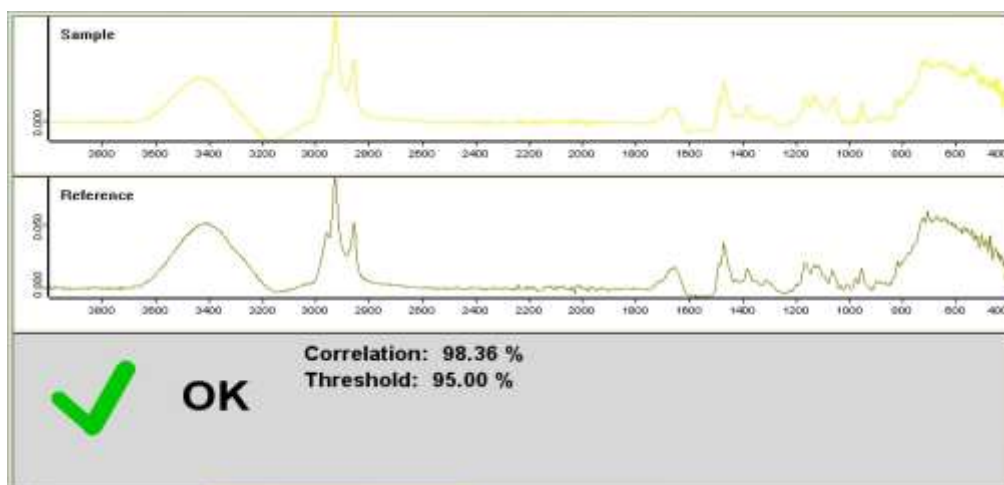


Figura 18: Comparação dos espectros do dia inicial e o dia final do estudo para a F.N. com a correlação correspondente.

A diferença obtida entre o espectro de ambas as fórmulas após os 90 dias a 40 °C quando comparadas com o espectro obtido no primeiro dia (figuras 17 e 18) devem-se ao facto das matérias-primas ativas e não ativas sofrerem alterações a nível estrutural e comportamental, ou seja, houve alterações nas ligações químicas existentes nos componentes do produto, no entanto uma correlação superior a 95% é indicadora de uma boa estabilidade. É de realçar, no entanto, que a fórmula nova apresentou uma correlação maior, ou seja, menos alterações estruturais na composição fórmula.

### 3.2 Ensaio com *E. coli*

Os ensaios com a bactéria Gram-negativa em estudo iniciaram-se com a criação de uma reta de calibração que relaciona a luz emitida (RLU) e o número de unidade formadoras de colónias (UFC) (Figura 19). Desta forma, é então possível quantificar o número de UFC a partir da luz emitida de cada amostra. Esta relação permitiu avaliar a diminuição do número de UFC após a aplicação do biocida ao longo do tempo para os diferentes ensaios realizados.

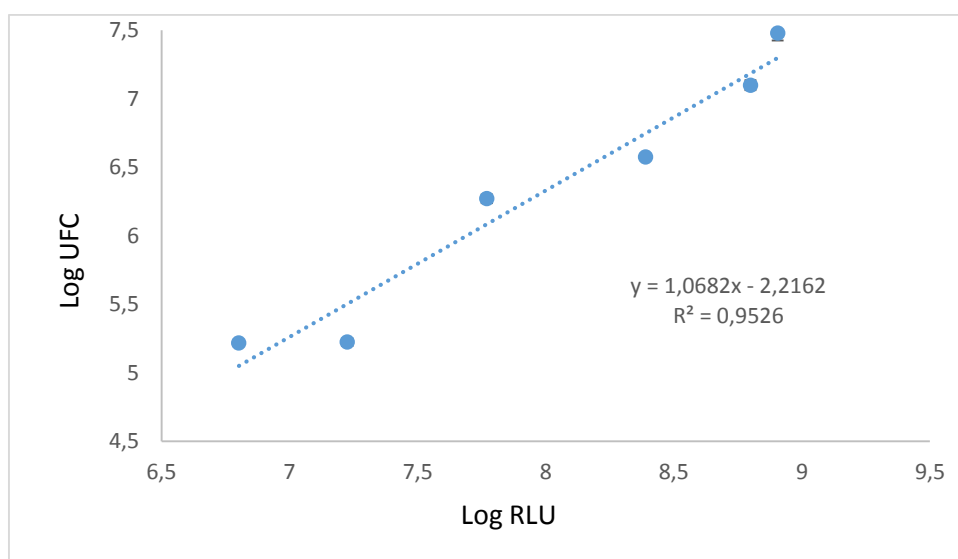


Figura 19: Relação linear entre número de unidades formadoras de colónia de *E. coli* e a luz emitida medida no luminómetro.

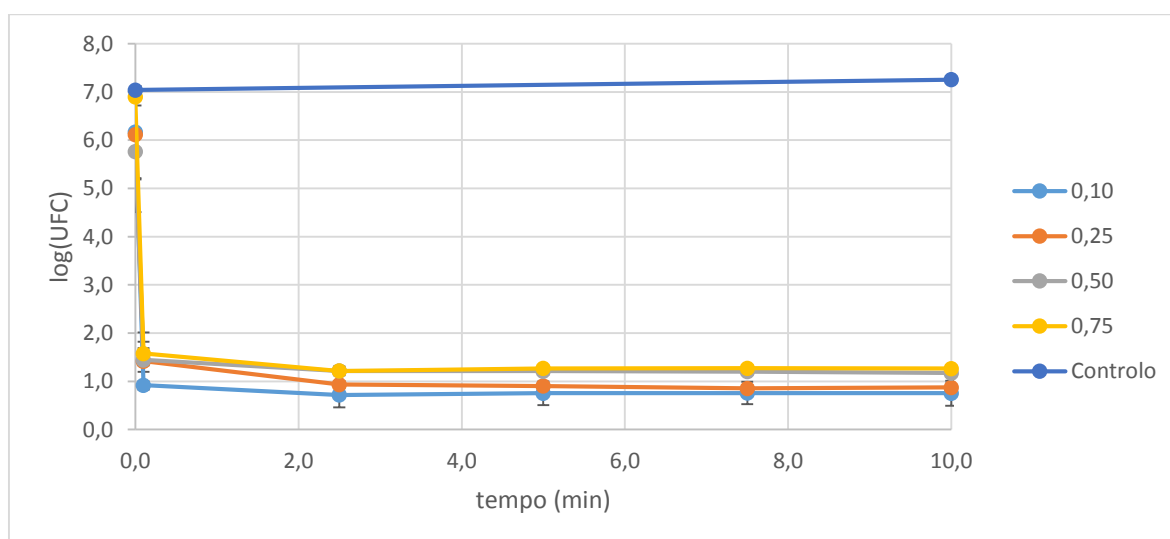


Figura 20: Redução de UFC de *E. coli* ao longo do tempo para diferentes concentrações [0,10; 0,25; 0,5; 0,75] % de DMC-80 F.A.



Na Figura 20 apresentam-se os resultados da variação de UFC obtidos para os ensaios em que se utilizou DMC F.A.. Os resultados obtidos com esta fórmula mostram que o produto necessita de um período de tempo muito curto para atuar, sendo precisos poucos segundos (0,1 min) para inativar *E. coli*. A bactéria foi inativada até ao limite de deteção do método (200 RLU) ao fim de 0,1 min, obtendo-se uma redução de cerca de 6 log RLU, que foi significativamente diferente do valor observado no controlo ( $p < 0,05$ ). Para este ensaio calculou-se a redução logarítmica de colónias no tempo total dos ensaios (10 min), ou seja, a eficácia de desinfecção para as quatro concentrações de DMC-80 FA testadas (Tabela 5).

*Tabela 5: Compilação de resultados de redução (log) e eficácia (%) para as diferentes concentrações estudadas no tempo total dos ensaios com E. coli usando a DMC-80 F.A.*

| [DMC-80] % | Log UFC t=0 (min) | $\sigma$ (Log UFC t=0 (min)) | Log UFC t=10 (min) | $\sigma$ (Log UFC t=10 (min)) | Redução (log) | Eficácia (%) |
|------------|-------------------|------------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------|--------------|
| 0,10       | 6,167             | 0,957                        | 0,526              | 0,258                         | 5,641         | 91,47        |
| 0,25       | 6,114             | 0,927                        | 0,626              | 0,089                         | 5,488         | 89,77        |
| 0,50       | 5,761             | 1,252                        | 0,796              | 0,044                         | 4,965         | 86,18        |
| 0,75       | 6,901             | 0,183                        | 0,787              | 0,071                         | 6,114         | 88,60        |

Com o cálculo da eficácia consegue-se perceber que a fórmula atualmente utilizada pela Mistolin S.A., DMC-80 F.A., é bastante eficaz mesmo em valores de concentração muito baixos, eliminando acima de 85% das células presentes na suspensão celular (Tabela 5).

No caso da fórmula nova proposta, DMC-80 F.N., os resultados obtidos foram semelhantes (Figura 21).

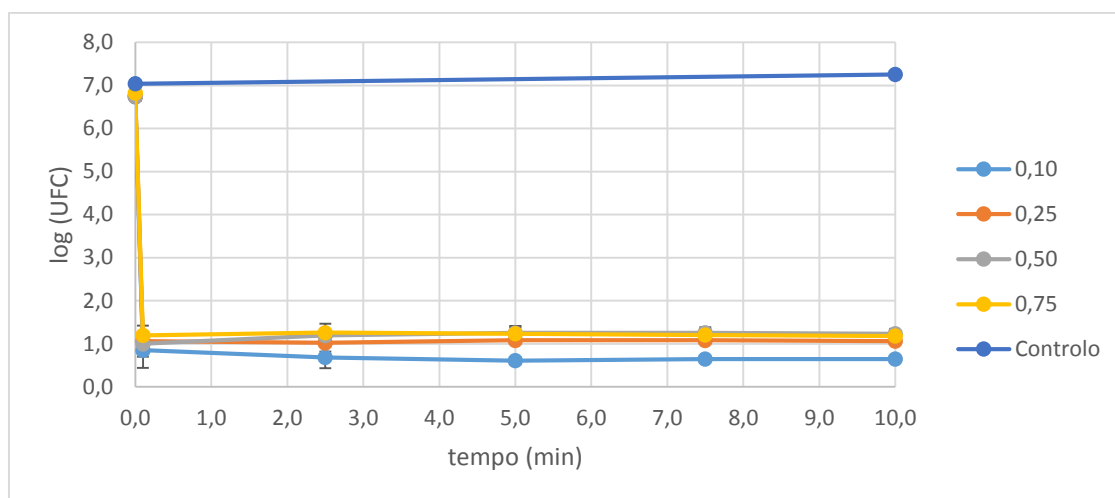


Figura 21: Redução de UFC de *E. coli* ao longo do tempo para diferentes concentrações [0,10; 0,25; 0,5; 0,75]% de DMC-80 F.N.

A Figura 21 mostra os resultados dos vários ensaios realizados para as diferentes concentrações de DMC-80 F.N.. Da observação dos resultados é possível verificar que o comportamento foi semelhante aos resultados obtidos com a F.A.. Neste caso a inativação total ocorreu, imediatamente após a adição do composto na suspensão celular. A inativação total da suspensão de *E. coli* ocorreu entre o tempo 0 e o tempo 0,1 min.

Calculando a redução logarítmica de UFC para o tempo total dos ensaios (10 min), os resultados obtidos mostram-se como sendo ligeiramente melhores que os da F.A.. Com a F.N. a inativação ocorre também entre o tempo 0 e 0,1 min, no entanto esta fórmula apresenta uma eficácia de inativação de microrganismos superior a 90% (Tabela 6).

Tabela 6: Compilação de resultados de redução (log) e eficácia (%) para as diferentes concentrações estudadas no tempo total dos ensaios com *E. coli* usando a N.F.

| [DMC-80] % | Log UFC t=0 (min) | $\sigma$ (Log UFC t=0 (min)) | Log UFC t=10 (min) | $\sigma$ (Log UFC t=10 (min)) | Redução (log) | Eficácia (%) |
|------------|-------------------|------------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------|--------------|
| 0,10       | 6,733             | 0,082                        | 0,372              | 0,033                         | 6,362         | 94,48        |
| 0,25       | 6,749             | 0,067                        | 0,493              | 0,024                         | 6,256         | 92,70        |
| 0,50       | 6,763             | 0,112                        | 0,624              | 0,114                         | 6,139         | 90,78        |
| 0,75       | 6,830             | 0,063                        | 0,569              | 0,125                         | 6,261         | 91,67        |

### 3.3. Ensaios com *S. aureus*

Os ensaios com *S. aureus* foram efetuados para perceber a eficácia do biocida em estudo em bactérias Gram-positivas. Este grupo de bactérias são mais fáceis de inativar que as Gram-negativas, uma vez que o invólucro externo destas bactérias costuma ser mais fácil de destruir.

Tendo em conta os resultados obtidos com a *E. coli*, nestes ensaios foi apenas testada a concentração mais baixa de DMC-80, 0,1%, para as duas fórmulas.

Os ensaios tiveram uma duração de 10 minutos no total, no entanto verificou-se que ao fim de 5 minutos não existiam células viáveis na cultura. A bactéria foi inativada até ao limite de deteção do método (Figura 22).

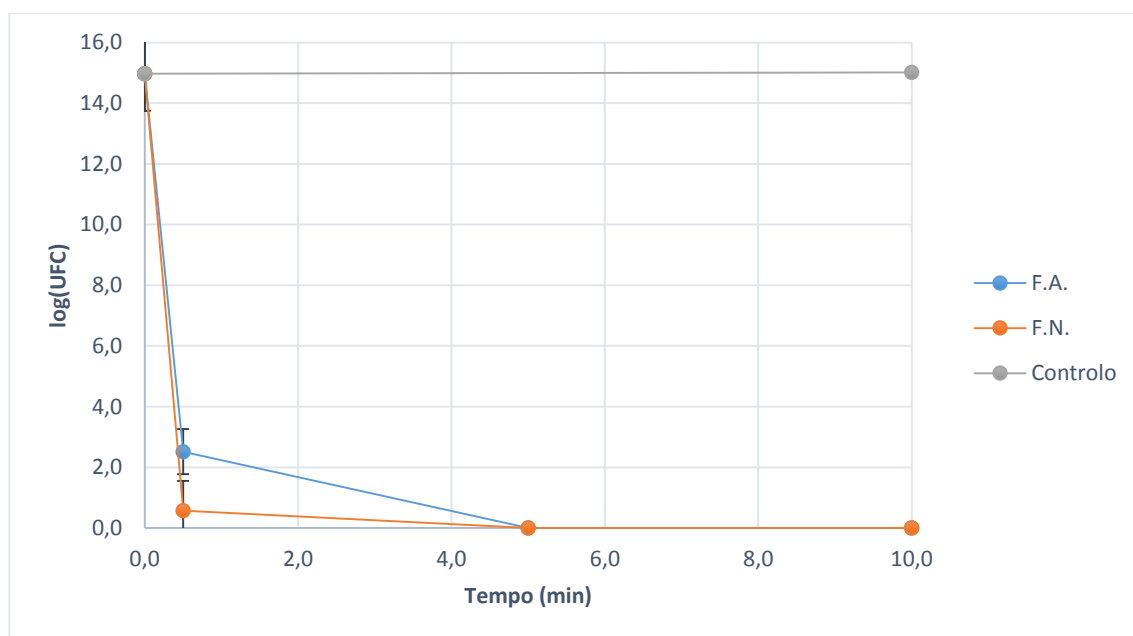


Figura 22: Redução de UFC de *S. aureus* nas presença de [0,1]% de DMC-80

À semelhança dos ensaios realizados com *E. coli* também foi calculada a redução logarítmica de colónias no tempo total dos ensaios (10 min) e a eficácia dos ensaios (Tabela 6).

Tabela 7: Compilação de resultados de redução (log) e eficácia (%) na inativação de *S. aureus*, com as diferentes fórmulas estudadas de DMC-80

| Fórmula [0,10%] | Média log UFC t=0 | $\sigma$ (Log UFC t=0 (min)) | Média log UFC t=10 | $\sigma$ (Log UFC t=10 (min)) | Redução (log) | Eficácia (%) |
|-----------------|-------------------|------------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------|--------------|
| F.A.            | 14,98             | 1,22                         | 0,00               | 0,00                          | 14,98         | 100,00       |
| N.F.            | 14,98             | 1,22                         | 0,00               | 0,00                          | 14,98         | 100,00       |

Através da Tabela 7 percebe-se que em ambas as fórmulas foi atingido uma eficácia de 100%, conseguindo eliminar a totalidade das células de *S. aureus* nos primeiros cinco minutos de todos os ensaios.

Os resultados obtidos após aplicação das duas fórmulas de DMC-80 na suspensão de *S. aureus* provou que o biocida foi bastante eficaz, eliminando todas as células viáveis existentes na suspensão bacteriana nos primeiros segundos dos ensaios. No entanto, verificou-se que DMC-80 F.A. foi ligeiramente mais lento, uma vez que no instante 0,1 min a inativação ainda não era tão elevada quando comparada com a N.F.

Sendo *S. aureus* uma bactéria Gram-positiva e, por isso, não apresentar membrana externa na parede celular, torna-a mais suscetível de ser inativada. Uma vez que os três princípios ativos do produto tem como zonas preferenciais de ataque nos microrganismos a parede celular. A maior permeabilidade das bactérias de Gram-positivo, devido à ausência da membrana externa na parede celular, facilita o ataque dos biocidas.

### 3.4 Ensaios com fagos

Nos ensaios realizados com o fago phT4 foram realizados utilizando DMC-80 FA e FN com a concentração de 0,5 %.

Para realizar estes ensaios o biocida foi adicionado à suspensão de fagos. No entanto, no momento de semear a esta suspensão, foi necessário adicionar como hospedeiro do fago cultura bacteriana de *E. coli*. Contudo, o biocida não só inativou o fago mas também o seu hospedeiro, não se obtendo qualquer crescimento de bactéria nas placas. Para isso, todas as suspensões de fago com o biocida foram diluídas dez vezes de forma a não provocar a morte do hospedeiro.

As análises foram realizadas nos tempos (0; 0,1; 2,5; 5; 7,5; 10) minutos, e mais uma vez o DMC-80 F.N. revelou-se, no primeiro tempo de amostragem, ligeiramente superior com uma redução de cerca de 3 log (UFC) enquanto o DMC-80 FA mostrou uma

redução de apenas 1 log (UFC). No entanto, ao fim de dois minutos e meio a redução foi total (Figura 23).

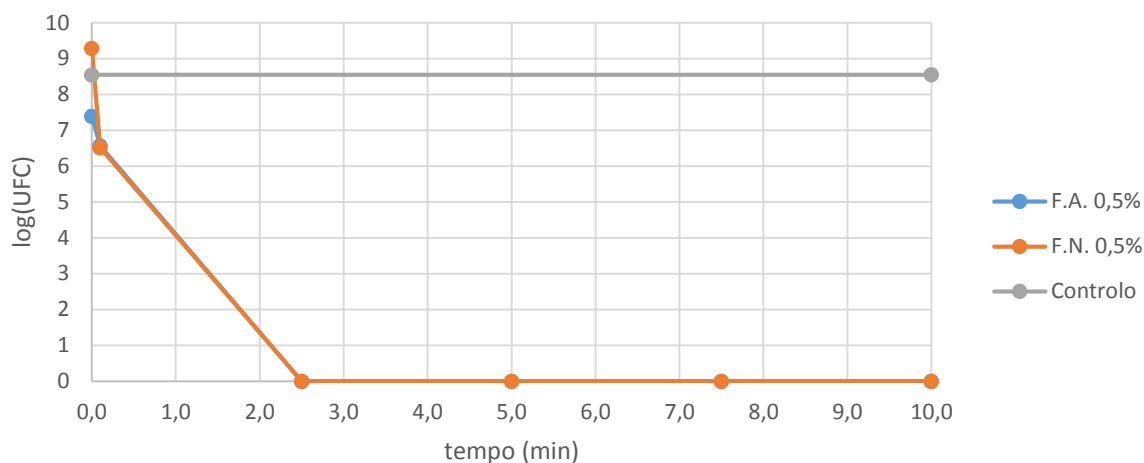


Figura 23: Redução de placas fágicas ao longo do tempo na presença das diferentes fórmulas de biocida.

À semelhança dos ensaios anteriores foi também calculada a redução logarítmica de colónias no tempo total dos ensaios (10 min) e a eficácia dos ensaios (tabela 8).

Tabela 8: Compilação de resultados de redução (log) e eficácia (%) para as diferentes fórmulas estudadas no tempo total dos ensaios com bacteriófago phT4

| [DMC-80]   | Log UFC t=0 (min) | $\sigma$ (Log UFC t=0 (min)) | Log UFC t=10 (min) | $\sigma$ (Log UFC t=10 (min)) | Redução (log) | Eficácia (%) |
|------------|-------------------|------------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------|--------------|
| F.A. 0,50% | 7,39              | 0,02                         | 0,00               | 0,00                          | 7,39          | 100,00       |
| F.N. 0,50% | 9,28              | 0,03                         | 0,00               | 0,00                          | 9,28          | 100,00       |

A Tabela 8 mostra que ambas as fórmulas são bastantes eficazes na inativação do fago phT4 tendo sido atingido eficácia de 100% e uma redução superior a 6 log.

Neste caso não existiu qualquer diferença entre as fórmulas, tendo ambas um comportamento e eficácia bastante semelhante.

### 3.5 Ensaio com *A. niger*:

Na Figura 24 apresentam-se os resultados dos ensaios com os testes das duas fórmulas de DMC-80 utilizando o fungo *A. Niger*. Uma vez que a inativação de fungos é mais difícil que a inativação de bactérias e de vírus (40) devido à frequente produção de esporos com elevada resistência, foram testadas duas concentrações diferentes das duas fórmulas de DMC-80, 0,25% e 0,50%.

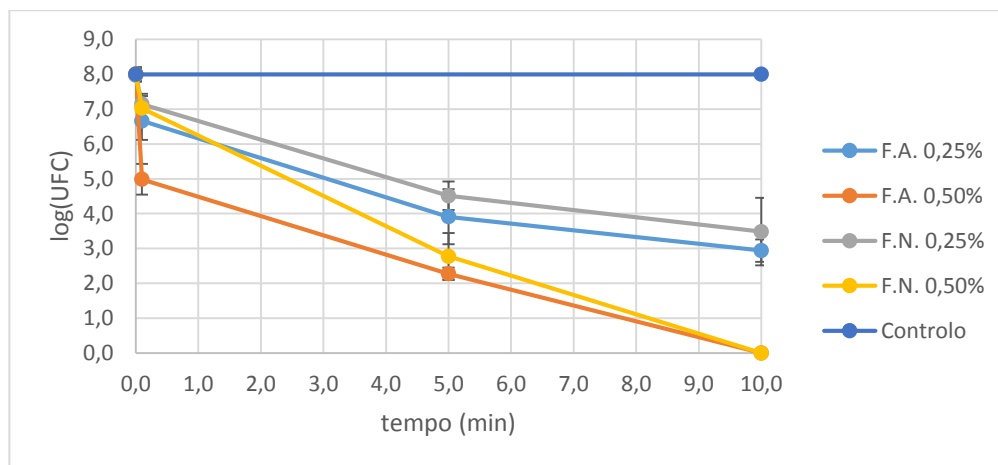


Figura 24: Redução de colónias de *Aspergillus niger* ao longo do tempo, na presença das diferentes fórmulas de biocida nas concentrações [0,25; 0,5]%

As duas concentrações foram testadas para um mesmo tempo de ensaios. Verificou-se que o tempo escolhido não foi suficiente para a inativação total com a concentração mais baixa em estudo, no entanto, com a concentração de 0,50% obteve-se uma inativação total com a morte de todos os fungos da cultura ao fim de dez minutos (figura 24). A maior dificuldade de inativação do fungo deveu-se ao facto deste produzir esporos, complicando assim o combate do mesmo por parte do biocida.

À semelhança dos ensaios anteriores foi também calculada a redução logarítmica de colónias no tempo total dos ensaios (10 min) e a eficácia dos ensaios (Tabela 8).

Tabela 9: Redução logarítmica e eficácia de inativação de *A. niger* na presença de DMC-80 na concentração de 0,25% e 0,50%

| DMC-80          | log UFC t=0<br>(min) | $\sigma$ (Log UFC t=0<br>(min)) | Log UFC t=10<br>(min) | $\sigma$ (Log UFC t=10<br>(min)) | Redução<br>(log) | Eficácia<br>(%) |
|-----------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------|-----------------|
| F.A.<br>[0,25]% | 7,98                 | 0,18                            | 2,94                  | 0,32                             | 5,04             | 63,13           |
| F.A.<br>[0,50]% | 8,00                 | 0,20                            | 0,00                  | 0,00                             | 8,00             | 100,00          |
| F.N.<br>[0,25]% | 8,00                 | 0,20                            | 3,48                  | 0,97                             | 4,51             | 56,44           |
| F.N.<br>[0,50]% | 8,00                 | 0,20                            | 0,00                  | 0,00                             | 8,00             | 100,00          |

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos na redução de UFC de *A. niger* assim como a eficácia associada para as diferentes fórmulas e concentrações. No caso do DMC-80 F.A. n a concentração de 0,25%, verificou-se uma redução total de 5 log correspondente a cerca 63% da concentração inicial fúngica. Já a concentração de 0,50% permitiu no tempo final dos ensaios uma inativação total de todos os fungos., ou seja, uma eficácia de 100% (Tabela 8).

Considerando o DMC-80 F.N., os resultados obtidos foram semelhantes, no entanto a sua eficácia foi ligeiramente inferior, devido ao seu carácter neutro. O DMC-80 F.N. a 0,25%, tanto no primeiro instante após aplicação como ao fim dos 10 minutos de ensaio, não foi tão eficaz como o obtido com DMC-80 F.A., não sendo portanto tão eficaz. Para a concentração de 0.5% apesar de se ter obtido uma eficácia total igual observou-se uma diminuição de UFC mais lenta.





## 4. Conclusão

---



#### 4.1 Conclusão e Perspetivas Futuras:

O grande objetivo desta dissertação foi perceber mais sobre as debilidades existentes na indústria agro-pecuária ao nível das contaminações microbiológicas e a utilização de biocidas na sua produção primária. Fazendo uma análise de custos ao DMC-80 e os produtos biocidas concorrentes, o DMC-80 é o que apresenta um melhor preço por % de matéria ativa e a alteração da fórmula não é significativa neste ponto de vista. De seguida testou-se a estabilidade e a capacidade de inativação de microrganismos da formulação desenvolvida atualmente pela Mistolin S.A., o DMC-80, e de uma alternativa apresentando um pH menos agressivo para o utilizador final durante o seu manuseamento assim como para as superfícies de contato.

Os testes de estabilidade realizados a 40 °C durante os 90 dias consecutivos determinaram a fórmula com menos alterações a nível estrutural. A comparação dos espectros obtidos através de FTIR no primeiro e ultimo dia do período de armazenamento evidenciaram menores alterações na F.N. que apresentou uma correlação de 98,4 %, face a 97,5 % para a F.A..

No que diz respeito aos ensaios microbiológicos, verificou-se que as formulações eram semelhantes, apesar dos diferentes valores de pH. O carácter ácido da F.A. mostrou ser diferenciador e mais eficaz somente nos ensaios com *Aspergillus niger*, onde conseguiu uma inativação mais rápida que a F.N.. No entanto, em todos os outros ensaios microbiológicos a F.N., apesar de ter uma eficiência muito semelhante à F.A., apresentou sempre uma maior velocidade de inativação.

Com os resultados obtidos pode-se concluir que o DMC-80 é, sem dúvida, um produto eficaz e com uma boa relação preço/ qualidade. A modificação introduzida na formulação, além de melhorar as características do produto, não encarece o produto final tornando o DMC-80 ainda mais vantajoso.

No futuro, deverão ser continuados os testes microbiológicos utilizando outros microrganismos como alvo, no sentido de continuar a demonstrar que o produto é tão ou mais eficaz que os restantes, e desta forma aproximar o DMC-80 dos produtos líderes do mercado.



## 5. Bibliografia

---



## Bibliografia

1. Williams JF, Worley SD. Process Hygiene - Testing of disinfectants. Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier; 1999. 1794-1801 p.
2. Malcom DR. Development of an elective course in veterinary medicine with focus in communication. Curr Pharm Teach Learn. 2015 May;7(3):357-64.
3. Leslie EEC, Geong M, Abdurrahman M, Ward MP, Toribio J-ALML. Live pig markets in eastern Indonesia: Trader characteristics, biosecurity and implications for disease spread. Acta Trop. 2016 Mar;155:95-103.
4. Merricle A. Biocides. In: Encyclopedia of Toxicology. 1st ed. Elsevier; 2005. p. 279-80.
5. Mistolin S.A. [Internet]. [cited 2016 Feb 1]. Available from: <http://www.mistolin.pt/>
6. Michalak I, Chojnacka K. Biocides. In: Encyclopedia of Toxicology. 3rd ed. Elsevier; 2014. p. 461-3.
7. González LL, Gutiérrez Pérez MI, Lucio-Villegas Menéndez ME, Lluch NA, Morató Agustí ML, Cachafeiro SP. Introduction to antiseptics. Soc Española Med Fam y Comunitaria. Elsevier Doyma; 2014 May;46:1-9.
8. DGAV [Internet]. [cited 2016 Aug 1]. Available from: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/>
9. Regulamento relativo aos produtos biocidas (RPB) [Internet]. [cited 2016 Jan 27]. Available from: <http://echa.europa.eu/pt/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>
10. Arena Ansotegui J, Emparanza Knörr JI. Los antisépticos yodados no son inocuos. An Esp Pediatr. 2000;53:25-9.
11. Nalepa CJ, Azarnia FD. Development of a high activity liquid biocide for industrial water treatment. In: NACE - International Corrosion Conference Series. 2006.
12. Domingues P. Higiene Zootécnica. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - Universidade Estadual Paulista. 2008.

13. Reynaldo MB, Martínez AM, Flores MB, Magariños MDC. Alcohol etílico: Vigencia y efectividad frente a muestras clínicas grampositivas y gramnegativas. *Acta Bioquim Clin Latinoam*. 2002;36:401–7.
14. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:147–79.
15. Campbell A, Wexler PB. Thimerosal A2. In: *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition). 3rd ed. oxford; 2014. p. 546–8.
16. Denton GW. Chlorhexidine. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 1st ed. 2003. p. 274–89.
17. Bauer A. Contact dermatitis in the cleaning industry. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;13:521–4.
18. Glutaraldehyde MSDS [Internet]. [cited 2016 Jun 15]. Available from: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924161>
19. Methylal MSDS [Internet]. [cited 2016 Apr 16]. Available from: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927226>
20. Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ. Efficacy of improved hydrogen peroxide against important healthcare associated pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012 Nov;33:1159–61.
21. Crow S. Peracetic acid sterilization: a timely development for a busy healthcare industry. *Infect Control Hosp Epidemiol* . 1992;13:111–3.
22. McDonnell G. Sterilization and Disinfection. In: *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Elsevier; 2009. p. 529–48.
23. Brockmeier SL, Halbur PG TE. Porcine Respiratory Disease Complex. In: *Polymicrobial disease*. 2002.
24. Lo Presti A, Cella E, Giovanetti M, Lai A, Angeletti S, Zehender G. Origin and evolution of Nipah virus. *J Med Virol*. 2015;3:380–8.
25. Todd E, Grieg J. Viruses of foodborne origin: a review. *Virus Adapt Treat*. 2015;7:25–45.
26. Grilli C, Loschi AR, Rea S, Stocchi R, Leoni L, Conti F. Welfare indicators



- during broiler slaughtering. Br Poult Sci. 2015;56:1–5.
27. Van de Perre V, Permentier L, De Bie S, Verbeke G, Geers R. Effect of unloading, lairage, pig handling, stunning and season on pH of pork. Meat Sci. 2010;86:931–7.
  28. Mistolin. DMC-80 - Ficha técnica do produto . 2013.
  29. Lyon TC. Quaternary ammonia compounds: Should they be used for disinfection in the dental office? Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol. 1973;36:769–75.
  30. Yang J, Tezel U, Li K, Pavlostathis SG. Prolonged exposure of mixed aerobic cultures to low temperature and benzalkonium chloride affect the rate and extent of nitrification. Bioresour Technol. 2015;179:193–201.
  31. Bragg R, Jansen A, Coetzee M, van der Westhuizen W, Boucher C. Bacterial resistance to Quaternary Ammonium Compounds (QAC) disinfectants. Adv Exp Med Biol. 2014;808:1–13.
  32. Tezel U, Pierson JA, Pavlostathis SG. Effect of didecyl dimethyl ammonium chloride on nitrate reduction in a mixed methanogenic culture. Water Sci Technol. 2008;57:541–6.
  33. Theseo. TH5 dessinfetant - Ficha técnica do produto . 2014.
  34. Johnson Diversey Portugal. VIRAGRI PLUS VT 49 - Ficha técnica do produto. 2014. p. 1.
  35. DuPont. Virkon S - Ficha técnica do produto . 2014.
  36. Cuny C, Abdelbary MMH, Köck R, Layer F, Scheidemann W, Werner G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from infections in horses in Germany are frequent colonizers of veterinarians but rare among MRSA from infections in humans. One Heal. 2016;2:11–7.
  37. Santos André Luis dos, Santos Dilvani Oliveira, Freitas Cícero Carlos de, Ferreira Bruno Leal Alves, Afonso Ilídio F. RCR. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol e Med Lab. 2007;43:423–423.
  38. Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov V V., Arisaka F, Rossmann MG. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. Cellular and Molecular Life

Sciences. 2003;1–8.

39. Anderson ES, Kellenberger E, Gots JS, Jacob F, Wollman EL. Antigenic Properties. In: Bacteriophages. 1st ed. London: Interscience; 1937. p. 97–119.
40. Pedrosa Costa C, Silva DG, Rudnitskaya A, Almeida A, Rocha SM. Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome. *Sci Rep*. 2015;6:1–13.
41. Perkins WD. Fourier transform infrared spectroscopy. Part III. Advantages of FT-IR. *J Chem Educ*. 1987;64:296–305.
42. Alves E, Costa L, Cunha Â, Faustino MAF, Neves MGPMS, Almeida A. Bioluminescence and its application in the monitoring of antimicrobial photodynamic therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;92:1115–28.
43. Alves E, Carvalho CMB, Tomé JPC, Faustino MAF, Neves MGPMS, Tomé AC. Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2008. p. 1447–54.
44. Tavares A, Dias SRS, Carvalho CMB, Faustino MAF, Tomé JPC, Neves MGPMS. Photochemical & Photobiological Sciences Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10:1659–69.
45. Baptista I, Queirós RP, Cunha Â, Saraiva JA, Rocha SM, Almeida A. Inactivation of enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains by high pressure treatments and evaluation of its impact on virulence factors. *Food Control*. 2015;57:252–7.
46. Pereira C, Moreirinha C, Teles L, Rocha RJM, Calado R, Romalde JL. Application of phage therapy during bivalve depuration improves *Escherichia coli* decontamination. *Food Microbiol*. 2017;61:102–12.